

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Caractérisation de la résistance à la bacitracine et
évaluation *in vitro* de bactériophages envers les
Clostridium perfringens aviaires**

par

Louis-Alexandre Jalbert

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Janvier 2008

© Louis-Alexandre Jalbert, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation de la résistance à la bacitracine et évaluation *in vitro* de
bactériophages envers les *Clostridium perfringens* aviaires**

présenté par :

Louis-Alexandre Jalbert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Michaël Mourez, président-rapporteur
Dre. Marie Archambault, directrice de recherche
Dre. Ann Letellier, codirectrice
Dre. Josée Harel, codirectrice
Dr. Carl A. Gagnon, membre du jury

Résumé

L'entérite nécrotique est une maladie de la volaille causant de sévères pertes économiques à travers le monde. Elle est causée par une surcroissance de *Clostridium perfringens* dans l'intestin des oiseaux atteints. En Amérique du Nord, cette maladie est contrôlée par des antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance, notamment la bacitracine. Des cas de résistance à la bacitracine ont été rapportés dans la littérature, mais aucun mécanisme génétique de la résistance à la bacitracine n'a été découvert jusqu'à présent. Il a été supposé que la résistance à la bacitracine était due à des gènes non identifiés jusqu'à présent et qu'un cocktail de bactériophages est efficace pour lyser des souches commensales de *C. perfringens*. Les objectifs de cette étude sont d'établir des profils de résistance phénotypique à la bacitracine chez des souches de *C. perfringens* isolées de poulets et de dindes élevés au Québec, de déterminer les gènes responsables de la résistance à la bacitracine chez *C. perfringens* et de vérifier *in vitro* le potentiel lytique de bactériophages contre une banque d'isolats de *C. perfringens*. Un total de 156 isolats de *C. perfringens* ont été obtenus à partir de matières fécales de poulets et de dindes provenant de 4 abattoirs situés au Québec. La résistance phénotypique à la bacitracine a été déterminée dans 99 de ces isolats par la méthode du Etest. Les gènes associés à la résistance envers la bacitracine ont été identifiés puis séquencés par la technique de marche sur l'ADN. Un total de 26 isolats (26%) a démontré de la résistance à la bacitracine ($>16 \mu\text{g/ml}$). De nouveaux gènes de résistance à la bacitracine, nommés *bcrR*, *bcrA*, *bcrB* et *bcrD* ont été identifiés et séquencés. Les gènes *bcrA* et *bcrB* codent pour un transporteur ABC. Le gène *bcrD* code pour une undecaprenol kinase et le gène *bcrR* code pour un régulateur de la famille XRE. Leur localisation plasmidique a été démontrée par hybridation. Le potentiel lytique d'un cocktail formé de deux phages isolés dans cette étude, $\Phi 2084$, $\Phi 2450$, et d'un phage caractérisé préalablement, $\Phi 3626$, a été ensuite testé sur l'ensemble des isolats. Le cocktail lyse 55 souches, soit 35% de notre banque de souches. Cette étude a identifié pour la première fois des gènes de résistance à la bacitracine chez *C. perfringens* et a démontré le potentiel lytique *in vitro* d'un cocktail de bactériophages envers des souches de *C. perfringens* d'origine aviaire.

Mots-clés : *Clostridium perfringens*, entérite nécrotique, antibiorésistance,

bacitracine, gène de résistance, transporteur ABC, plasmides, bactériophages, tests de lyse, cocktail de phages

Abstract

Necrotic enteritis is a disease causing economic losses in poultry breeders worldwide. It is caused by an overgrowth of *Clostridium perfringens* in the gut. In North America, the disease is controlled by antibiotic growth promoters, mainly bacitracin. Resistance to bacitracin among *C. perfringens* isolates have been described, but no genetic mechanism has been found. It has been proposed that unidentified genes are responsible for bacitracin resistance and that a cocktail of bacteriophages is able to lyse *C. perfringens* strains isolated from the normal microflora of poultry. The objectives of this study were to determine phenotypic resistance to bacitracin in *Clostridium perfringens* isolates recovered from Quebec chicken and turkey processing plants, to identify and sequence genes implicated in bacitracin resistance, and to evaluate the *in vitro* lytic potential of bacteriophages against a culture collection of *C. perfringens* isolates. A total of 156 isolates were recovered from chicken and turkey feces obtained from 4 processing plants located in Quebec. Phenotypic resistance was measured by the Etest method in 99 isolates. Resistance genes were identified and sequenced by primer walking. A total of 26 isolates showed resistance to bacitracin ($>16 \mu\text{g/ml}$). Bacitracin resistance genes, designated *bcrR*, *bcrA*, *bcrB* and *bcrD*, were discovered and sequenced. The *bcrA* and *bcrB* genes encode for an ABC transporter. The *bcrD* gene encode for an undecaprenol kinase and the *bcrR* gene encode for a regulator of the XRE family. The lytic potential of a cocktail of two bacteriophages discovered in this study $\Phi 2084$ and $\Phi 2450$ with a previously characterized phage $\Phi 3626$ was tested on every isolate. The cocktail is lytic against 55 isolates, or 35% of our culture collection. This study reports for the first time the characterization of bacitracin resistance genes in *C. perfringens* and demonstrates the *in vitro* lytic potential of a cocktail of three phages against field isolates of *C. perfringens*.

Keywords : *Clostridium perfringens*, necrotic enteritis, resistance to antibiotics, bacitracin, ABC transporter, plasmids, bacteriophages, lytic tests, cocktail of phages

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	1
1. Introduction.....	1
2. Recension de la littérature.....	4
2.1. <i>Clostridium perfringens</i>	5
2.1.1. Description du genre <i>Clostridium</i> spp.	5
2.1.2. Description de l'espèce <i>Clostridium perfringens</i> et méthodes d'isolement	5
2.1.3. Classification et pathogénicité des types de <i>Clostridium perfringens</i>	6
2.1.4. Organisation génétique du chromosome.....	8
2.1.5. Toxines de <i>Clostridium perfringens</i>	9
2.2. Entérite nécrotique.....	12
2.2.1. Signes cliniques et épidémiologie.....	12
2.2.2. Facteurs prédisposants	14
2.2.3. Forme sous-clinique.....	15
2.2.4. Impacts économiques.....	15
2.2.5. Traitement et contrôle	16
2.3. Bacitracine	17
2.3.1. Généralités et mode d'action	17
2.3.2. Résistance à la bacitracine	18
2.3.2.1. Résistance phénotypique.....	18
2.3.2.2. Résistance génotypique.....	19
2.4. Bactériophages.....	21
2.4.1. Historique et description des bactériophages.....	21
2.4.2. Classification des bactériophages	23
2.4.3. Thérapie par les bactériophages.....	25
2.4.3.1. Historique de thérapie par les bactériophages.....	25

2.4.3.2.	Essais récents de thérapie par les phages	26
2.4.3.3.	Difficultés liées à l'utilisation de phages	28
3.	Articles scientifiques.....	32
3.1.	Characterization of new genes encoding for acquired bacitracin resistance in <i>Clostridium perfringens</i>	33
3.2.	In vitro determination of lytic potential of two new bacteriophages against <i>Clostridium perfringens</i>	59
4.	Discussion	76
5.	Conclusion	85
6.	Bibliographie.....	88
7.	Publications et communications.....	100

Liste des tableaux

Recension de la littérature

Tableau I : Classification de <i>C. perfringens</i> selon la production de toxine.....	7
Tableau II : Classification des bactériophages selon l'International Committee for Taxonomy of Viruses.....	24
Tableau III : Essais récents de thérapie phagique chez les animaux	28

Articles Scientifiques

1er article:

Table 1. Primers for sequencing novel bacitracin resistant genes of <i>C. perfringens</i> strain c1261_A using the primer walking method.....	50
Table 2. MIC ₅₀ , MIC ₉₀ and percentages of bacitracin resistance build on MIC distributions of <i>C. perfringens</i> isolates from turkeys and chicken broilers.	51

2ème article:

Table 1. Lysis efficiency of <i>C. perfringens</i> bacteriophages	70
---	----

Liste des figures

Recension de la littérature

Figure 1. Molécule de bacitracine.....	17
Figure 2. Mode d'action de la bacitracine.....	18
Figure 3. ABC transporteur d' <i>Enterococcus faecalis</i>	21
Figure 4. Cycle lytique et lysogénique d'un bactériophage.....	22

Articles scientifiques

Figure 1. Representative genotypes of <i>C. perfringens</i> recovered in this study.	52
Figure 2. Comparison between <i>Enterococcus faecalis</i> operon <i>bcrABD</i> and <i>C. perfringens</i> putative operon <i>bcrABD</i>	53
Figure 3. Plasmid profiling and hybridization of undigested plasmid DNA of the bacitracin resistant <i>C. perfringens</i> strain c1261_A.....	54
Figure 1. Representative genotypes of <i>C. perfringens</i> recovered in this study.	71

Liste des sigles et abréviations

Voici la liste ainsi que la définition des abréviations les plus utilisées dans le présent ouvrage.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTN: Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

BLASTP: Protein Basic Local Alignment Search Tool

CDC: Center for Disease Control

CFU: Colony Forming Units

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMI₅₀ : Concentration minimale inhibant 50% des bactéries

CMI₉₀ : Concentration minimale inhibant 90% des bactéries

CPE : *Clostridium perfringens* enterotoxin

ICTV: International Committee for Taxonomy of Viruses

IPP: Isoprenyl pyrophosphate

MIC : Minimal inhibitory concentration

MIC₅₀ : Minimal inhibitory concentration for 50% of the isolates

MIC₉₀ : Minimal inhibitory concentration for 90% of the isolates

ORF : Open reading frame

PFGE: Pulsed-field Gel Electrophoresis ou Électrophorèse en champs pulsés

PFU : Plaques forming units

ssp: Sous-espèce

spp: Espèces

UFC : Unité formant des colonies

UFP : Unité formant des plaques

UP : Undecaprenyl phosphate

UPP : Undecaprenyl pyrophosphate

XRE : Xenobiotic Response Element

Remerciements

Merci à Marie Archambault, ma directrice de maîtrise, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir épaulé tout au long de ma maîtrise.

Merci à mes co-directrices, Josée Harel et Ann Letellier, pour leur supervision, leurs conseils et pour avoir été présentes lorsque j'en avais besoin.

Merci à Julie Blouin, Cindy-Love Tremblay et Audrey Charlebois pour votre aide, vos conseils et votre patience.

Merci aux membres de mon comité conseil et aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

Merci aux professeurs, aux étudiants et au personnel membres du GREMIP pour leurs trucs, leur aide scientifique et leurs commentaires

Merci au Poultry Industry Council pour sa contribution financière au projet.

1. Introduction

L'entérite nécrotique est une maladie qui affecte les troupeaux de volaille à travers le monde. Elle est causée par une surcroissance de *Clostridium perfringens* dans l'intestin des oiseaux affectés, et les toxines produites par les bactéries endommagent la paroi intestinale des oiseaux affectés (155). Le taux de mortalité de la maladie est très variable, allant de 2% à 50%, mais lors de grandes épidémies, la mortalité peut atteindre 1% du cheptel (159). Les pertes économiques engendrées par la maladie peuvent être considérables. Des études effectuées en Norvège ont démontré qu'une épidémie d'entérite nécrotique peut diminuer les revenus d'un producteur de plus de 40% (93). De plus, la maladie existe sous une seconde forme, la forme sous-clinique, qui cause des pertes de productivité pouvant coûter jusqu'à 0,05\$ par oiseau (151).

Un des principaux moyens de contrôle du *C. perfringens* dans les élevages de volaille est l'utilisation de la bacitracine, soit comme promoteur de croissance, en prophylaxie ou en thérapie. La bacitracine est un antibiotique de la famille des polypeptides cycliques qui inhibe la synthèse de la paroi de peptidoglycan chez certaines bactéries à Gram positif (143). La virginiamycine est un antibiotique de la famille des streptogramines qui peut être utilisé à la place de la bacitracine pour contrôler la prolifération des *C. perfringens*, mais son coût plus élevé diminue son utilisation dans les élevages de volaille.

Il existe plusieurs études détaillant la présence de résistance phénotypique à la bacitracine chez *C. perfringens* (31, 74, 158), mais aucun mécanisme génétique n'a été identifié. Le principal mécanisme de résistance à la bacitracine décrit chez *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* et *Enterococcus faecalis* est un transporteur ABC qui utilise l'énergie formée par la déphosphorylation d'une molécule d'ATP pour expulser la molécule de bacitracine hors de la cellule (15, 96, 113, 120, 149).

Parmi les avenues proposées pour remédier à l'apparition de résistance aux antibiotiques, on retrouve l'usage judicieux des antibiotiques et l'utilisation d'alternatives à ceux-ci. En effet, l'Union Européenne a banni l'usage des antibiotiques comme promoteur de croissance depuis janvier 2006 (40), alors que leur utilisation est toujours en vigueur en Amérique du Nord. L'une des avenues proposées pour remédier à l'apparition de résistance aux antibiotiques est l'utilisation de bactériophages. Ceux-ci sont des virus bactériens qui

peuvent lyser les bactéries, mais ne peuvent envahir ou se répliquer à l'intérieur de cellules eucaryotes. Des études ont démontré l'efficacité des bactériophages pour lutter contre des infections à *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et à *Escherichia coli* chez le poulet (67, 70, 148). Des bactériophages se sont également avérés efficaces pour réduire la colonisation de l'intestin de poulets par *Campylobacter jejuni* et *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (48, 154).

Ce projet a donc été divisé en deux principaux axes ayant chacun leur hypothèse. La première hypothèse est la suivante : il existe des souches de *C. perfringens* résistantes à la bacitracine au Québec et cette résistance est due à des gènes non identifiés jusqu'à présent. La seconde hypothèse est qu'un cocktail de bactériophages est efficace pour lyser des souches de *C. perfringens* provenant de la flore normale de poulets et de dindes. Le projet a été divisé en deux objectifs principaux, le premier étant de détecter la présence de résistance à la bacitracine chez des isolats québécois de *C. perfringens* et d'identifier les gènes responsables de cette résistance. Le second est de vérifier l'efficacité *in vitro* d'un cocktail de bactériophages contre une collection d'isolats québécois de *C. perfringens* d'origine aviaire.

2. Recension de la littérature

2.1. *Clostridium perfringens*

2.1.1. Description du genre *Clostridium* spp.

Le genre *Clostridium* spp. comprend des bacilles à Gram positif anaérobies ou aérotolestants formant des endospores. Celles-ci sont ovales ou rondes et sont déformantes. (4, 29). Les clostridies sont des microorganismes fastidieux qui nécessitent la présence d'acides aminés, d'hydrates de carbone et de vitamines pour croître (16). La température de croissance optimale est de 37°C et le pH optimal se situe entre 6,5 et 7. Les endospores sont résistantes à la chaleur, à la dessiccation, à l'irradiation et à la plupart des désinfectants (16, 28, 146). Le genre *Clostridium* spp. comprend plus d'une centaine d'espèces (28), mais la plupart sont des habitants normaux de l'environnement ou de l'intestin et sont inoffensifs pour les humains et les animaux.

2.1.2. Description de l'espèce *Clostridium perfringens* et méthodes d'isolement

Clostridium perfringens est présent dans l'air, dans le sol, la poussière ainsi que dans l'eau et dans le tractus intestinal des humains et de plusieurs espèces animales (28). Elle est parmi les espèces de clostridies les plus communément isolées chez l'humain et dans la nature (4). Les cellules bactériennes se présentent sous la forme de bâtonnets droits arrangés en solo ou en paires. Elles sont à Gram-positif, non-mobiles (sans flagelle) et peuvent être capsulées ou non. Leurs endospores sont larges, ovales, subterminales et elles déforment la cellule.

Même si certaines souches de *C. perfringens* sont aérotolestantes, la bactérie croît mieux en conditions anaérobiques et elle ne peut sporuler qu'en conditions anaérobiques. Sur gélose au sang, elle produit une zone de double hémolyse caractéristique qui est due aux toxines qui sont sécrétées. Une première zone d'hémolyse complète est attribuée à la toxine theta et une zone plus large d'hémolyse incomplète due à la toxine alpha (29). La température de croissance

optimale de *C. perfringens* est de 45°C, quoique certaines souches puissent croître aussi bien à 37°C. *C. perfringens* est positif pour les tests de fermentation du fructose, du lactose, du maltose, du mannose et du sucrose ainsi que pour les tests de production lécithinase et de production de H₂S. Les tests de mobilité, de production d'indole et de production de lipase ainsi que les tests de fermentation du xylose sont négatifs.

L'isolement de *C. perfringens* à partir d'échantillons animaux se fait sur des géloses sélectives ou sur des géloses sang contenant un antibiotique. Parmi les géloses sélectives les plus fréquemment utilisées, on retrouve la gélose PEA qui contient de l'alcool phényléthylique, un agent inhibant la croissance des *Enterobacteriaceae* (4, 41), ainsi que la gélose TSC, dont l'efficacité repose sur la tolérance de *C. perfringens* contre la D-cyclosérine et sur sa capacité à produire du H₂S (63). La gentamycine (18), la kanamycine (55) et la néomycine (7, 158) facilitent l'isolement de *C. perfringens* en inhibant la croissance des contaminants. Dans certains cas, la population de *C. perfringens* doit être amplifiée pour permettre un isolement efficace. Une incubation préalable dans un bouillon cooked meat est alors utilisée (7, 41).

2.1.3. Classification et pathogénicité des types de *Clostridium perfringens*

Les *C. perfringens* se subdivisent en 5 types (A, B, C, D, E) selon la production de 4 exotoxines létales les plus importantes (α , β , ϵ , ι) (Tableau 1). Une autre toxine d'importance clinique, l'entérotoxine CPE, ne fait pas partie du système de classification, puisqu'elle a été retrouvée dans les types A, B, C et D. Les souches exprimant l'entérotoxine sont considérées comme entérotoxigéniques, en plus de leur type traditionnel. La littérature fait également mention de cas cliniques dus à des clostridies qui n'ont pu être typés (140).

Tableau I : Classification de *C. perfringens* selon la production de toxine

Type de <i>C. perfringens</i>	Toxines produites			
	α (alpha)	β (bêta)	ϵ (epsilon)	ι (iota)
A	(+)	(-)	(-)	(-)
B	(+)	(+)	(+)	(-)
C	(+)	(+)	(-)	(-)
D	(+)	(-)	(+)	(-)
E	(+)	(-)	(-)	(+)

Le type A est celui qui est le plus distribué dans l'environnement. Il est également l'agent causal de la gangrène gazeuse. Il cause des entérotoxémies chez l'agneau et le cheval ainsi que des dermatites et l'entérite nécrotique chez la volaille. Les souches produisant l'entérotoxine CPE sont responsables d'empoisonnements alimentaires chez l'humain. On estime qu'aux États-Unis, les *C. perfringens* de type A produisant l'entérotoxine CPE sont une des principales causes d'empoisonnement alimentaire (4).

Le type B cause des entérotoxémies chez les moutons, les chèvres, les vaches et chez certains oiseaux. Il est retrouvé plus couramment en Europe, en Afrique et au Moyen-Orient. Le type C produit une intoxication sévère chez le mouton, ainsi que des entérites hémorragiques chez les vaches, les oiseaux, les agneaux et les porcelets. Le type C est également un agent causal de l'entérite nécrotique chez la volaille et chez l'humain, bien qu'il ne soit pas isolé aussi souvent que le type A. Sa distribution est mondiale. Le type D cause des entérotoxémies chez les jeunes moutons et chèvres. Le type E cause des entérotoxémies chez les moutons et les vaches. Il a été isolé en Grande-Bretagne, en Amérique du Nord et en Australie (16, 28). En raison de sa présence beaucoup plus importante dans l'environnement, les *C. perfringens* de type A sont ceux qui sont le plus souvent isolés de cas cliniques en médecine vétérinaire.

2.1.4. Organisation génétique du chromosome

La première équipe à faire une carte génétique du génome de *C. perfringens* fut celle de Canard et Cole en 1989 (25). La souche choisie fut la souche CPN50 qui est associée à des pathogénies chez l'humain. Ils ont découvert un seul chromosome circulaire dont la taille fut estimée à 3,58 Mb par électrophorèse à champs pulsés. L'analyse de sa carte génétique indique que les toxines α (gène *plc*) et θ (gène *pfoA*), deux toxines (discutées à la section 2.1.5) situées sur le chromosome, se retrouvent dans une région très conservée du génome et très proche de l'origine de réplication du chromosome, *oriC*. Les travaux de l'équipe d'Ohtani en 1997 (114) ont permis d'ajouter la toxine κ (gène *colA*) au groupe de toxines situées près de l'origine de réplication. Les travaux de Canard et Cole (25) ont aussi permis de déterminer que les cinq types de *C. perfringens* sont similaires sur le plan génétique, et que la variation de la production de toxines serait due à l'acquisition ou à la perte d'éléments génétiques dans les régions hypervariables et dans les plasmides (25).

La première séquence complète d'une souche de *C. perfringens* fut celle de la souche 13 associée à la gangrène gazeuse chez l'humain (134). En 2006, une équipe a séquencé 2 nouvelles souches de *C. perfringens*, la souche de référence ATCC 13124 et la souche SM101 qui produit l'entérotoxine CPE et qui est impliquée dans les cas d'empoisonnement alimentaire chez l'humain (106). La comparaison des 3 génomes a permis d'identifier de grands îlots putatifs de pathogénicité qui pourraient contenir des gènes de toxines, de catabolisme, des facteurs de virulence ou des gènes de résistance aux antibiotiques (106).

Les niveaux de production de plusieurs toxines dont les gènes sont situés sur le chromosome sont régulés par un même système de régulation, soit le système à deux composants VirR/VirS (95, 133). Le premier composant, VirS, est une protéine senseur comprenant plusieurs domaines transmembranaires et un résidu histidine qui s'autophosphoryle lors de la liaison du substrat (95). La protéine régulatrice, VirR, est activée par le senseur VirS et régule la transcription de certaines toxines en se

liant à l'ADN (133). Les gènes codant pour ces protéines sont organisés en opéron (9). Le système VirR/VirS régule la transcription des toxines θ , κ , α , ainsi que l'hémagglutinine et certaines protéases et sialidases (9). Les études subséquentes ont permis de démontrer que VirR se lie à deux séquences répétées imparfaites situées en amont du gène *pfoA* codant pour la toxine θ (35) et que l'ARN polymérase se lie mieux au promoteur de *pfoA* en présence de VirR (34), ce qui laisse à penser que l'activation transcriptionnelle causée par VirR serait due à des interactions protéine-protéine. Shimizu *et al* (135) ont trouvé un ARN régulateur qui serait impliqué dans la régulation des effets de VirR sur la production des toxines κ et α . La délétion de la partie 3' de l'ARN suffirait pour diminuer la production de ces toxines.

2.1.5. Toxines de *Clostridium perfringens*

Chez les différentes souches de *C. perfringens*, 17 toxines sont présentement connues. Les plus étudiées sont les quatre toxines létales qui servent à la classification des types de *C. perfringens* (α (alpha), β 1 (bêta), ϵ (epsilon), ι (iota)) ainsi que l'entérotoxine CPE qui est responsable des empoisonnements alimentaires et des diarrhées associées à une prise d'antibiotiques (98), et la toxine β 2 qui est associée à une hausse de la virulence chez certaines espèces animales (52, 56, 131). Les autres exotoxines (δ (gamma), θ (theta), κ (kappa), λ (lambda), μ (mu), ν (nu), neuraminidases et uréases) semblent avoir peu d'implication clinique. Une nouvelle toxine récemment découverte (5) chez les *C. perfringens* de type C est toxique pour les souris et les cellules de type Vero. Elle présente une homologie avec les toxines clostridiales larges présentes chez *Clostridium difficile*.

La toxine α (alpha) est une phospholipase C sphingomyélinase. Elle hydrolyse les phospholipides de la membrane cellulaire et entraîne une désorganisation membranaire. Des expériences ont montré que l'hydrolyse du phosphatidylcholine par la toxine alpha est plus efficace lorsque les chaînes d'acides gras composant la molécule sont courtes (107) ou insaturées (108). Ses propriétés dermonécrotiques, hémolytiques et létales lui donnent un rôle de choix dans le développement de la gangrène gazeuse chez l'humain. Le gène *plc* code pour la toxine et est situé sur le

chromosome bactérien, ce qui pourrait expliquer sa présence chez tous les types de *C. perfringens*. La toxine alpha fut longtemps associée à l'entérite nécrotique (155), mais une recherche publiée en 2006 démontre que des souches de *C. perfringens* ne produisant pas la toxine alpha peuvent causer l'entérite nécrotique (79).

Les toxines $\beta 1$ (gène *cpb*) et $\beta 2$ (gène *cpb2*) induisent une nécrose hémorragique dans la muqueuse intestinale (116). Les deux toxines sont cytotoxiques. La toxine $\beta 1$ peut s'oligomériser et former un pore sélectif pour les cations monovalents. Des études sur des souris ont démontré que la toxine $\beta 1$ est la principale toxine impliquée dans la toxémie causée par *C. perfringens* (50). Découverte plus récemment que les autres toxines (56), la toxine $\beta 2$ reste encore bien mal connue des chercheurs. Comme la toxine $\beta 1$, elle pourrait former des pores dans la membrane, mais elle serait d'une activité cytotoxique beaucoup plus faible (131). Des études chez le porcelet ont montré que les souches de *C. perfringens* isolées de porcelets souffrants d'entérite comportaient substantiellement plus de gène *cpb2* que les souches isolées d'animaux sains (23). Les études menées sur la volaille n'ont pas trouvé de lien entre la présence du gène *cpb2* et l'entérite nécrotique. Crespo et son équipe (2007) ont mesuré la fréquence de *cpb2* et son expression dans des souches aviaires de *C. perfringens*, sans trouver aucun lien entre la présence du gène et la maladie (41). Chalmers et ses collaborateurs (2007) ont mesuré un haut taux de *cpb2* dans des isolats provenant d'oiseaux sains (31). Les gènes codant pour ces deux toxines, *cpb* et *cpb2*, sont situées sur de larges plasmides, ce qui rend possible l'acquisition ou la perte de ces gènes (130).

La toxine ϵ (epsilon) entraîne la formation d'œdème dans plusieurs organes. Elle entraîne aussi la nécrose des reins et du cerveau chez le mouton (47). La protéine est sécrétée sous une forme inactive qui doit subir un clivage protéolytique du côté C-terminal et du côté N-terminal avant de devenir active. Une fois activée, la toxine se fixe à une protéine membranaire et forme un complexe de 155 kDa qui entraîne une diminution de la concentration d'ions K^+ et une augmentation des ions Cl^- , Na^+ et Ca^{2+} au niveau intracellulaire (117). Elle est située sur un plasmide, mais à l'intérieur d'un transposon délimité par la séquence d'insertion IS1151. Le

plasmide contenant la toxine epsilon a été prouvé comme étant conjugatif pour la première fois en 2007 (73). Une étude récente a démontré que les effets de la toxine epsilon sont augmentés lorsque la toxine est inoculée avec la toxine alpha ou la perfringolysine O (46).

De par sa structure, la toxine ι (iota) ressemble à la toxine C2 de *Clostridium botulinum* et l'ADP-ribosyltransférase de *Clostridium difficile*. La toxine est constituée de deux protéines : Ia et Ib. Ib s'attache à un récepteur membranaire et entraîne l'endocytose des deux protéines. Ia est ensuite transloquée dans le cytosol où elle catalyse l'ADP-ribosylation des monomères d'actine. Il fut démontré que la translocation de Ia se fait dans les « Endocytic carrier vesicles » et qu'elle nécessite un potentiel membranaire (57). Ceci entraîne une dépolymérisation des filaments d'actine, donc une désorganisation du cytosquelette et une inhibition des fonctions reliées au cytosquelette (116).

L'entérotoxine CPE n'est relâchée que lors de la sporulation de la bactérie. Elle forme un complexe avec des protéines de la membrane. Le complexe ainsi formé s'insère dans la membrane et devient un pore permettant la sortie rapide d'eau et d'électrolytes. La toxine interférerait aussi avec les jonctions serrées, notamment avec les claudines qui constituent une classe de protéines impliquées dans l'étanchéité des jonctions serrées (98). Les claudines 3, 4, 6, 7, 8 et 14 serviraient de récepteur pour la toxine. Des claudines non-réceptrices sont aussi retrouvées dans le complexe (126). Le gène codant pour l'entérotoxine, *cpe*, peut être situé dans le chromosome bactérien ou sur un plasmide (138). Il était connu que les souches isolées de cas d'empoisonnement alimentaire chez les humains présentaient le gène *cpe* sur le chromosome, alors que les souches produisant l'entérotoxine chez les animaux avait le gène *cpe* situé sur un plasmide d'une taille variant entre 100 kb et 120 kb (127). Toutefois, une étude récente sur des cas d'empoisonnement alimentaire à *C. perfringens* au Japon a démontré que des souches possédant le gène *cpe* sur un plasmide peuvent aussi causer des empoisonnements alimentaires (109). Une étude récente évalue jusqu'à 20% des cas d'empoisonnements alimentaires causés par *C. perfringens* portant le gène *cpe* sur un plasmide (85).

La façon dont le gène *cpe* est régulé pour n'être transcrit que lors de la sporulation est encore inconnue. Toutefois, on a découvert des promoteurs pour les facteurs sigma de type SigE et SigK en amont du gène *cpe* (127). Chez *Bacillus subtilis*, SigE et SigK sont des facteurs sigma activés uniquement durant la sporulation. L'hypothèse la plus probable serait donc que des facteurs sigma similaires au SigE et SigK de *B. subtilis* entraîneraient l'activation de la transcription de *cpe*. En outre, des expériences ont démontré que la régulation de *cpe* avait lieu au niveau de la transcription (127).

2.2. Entérite nécrotique

2.2.1. Signes cliniques et épidémiologie

Découverte en Australie en 1930 et caractérisée en 1961 par Parish (155, 159), l'entérite nécrotique chez la volaille a depuis été rapportée dans la plupart des endroits du monde où il y a production de volaille.

La maladie est causée par la bactérie *C. perfringens* de type A ou C (155). Chez le poulet, la maladie a pu être reproduite chez des animaux avec de la litière contaminée ou à l'aide d'une culture de *C. perfringens* administrée oralement, ou par voie intraveineuse ou bien mélangée à la nourriture. Chez le poulet et la dinde, la maladie est souvent associée à une coccidiose (155), particulièrement celle causée par le genre *Eimeria* (152). Une étude de 2007 a démontré que la coccidiose entraînait chez l'hôte une hausse de la production de mucus, ce qui favorisait la croissance de *C. perfringens* (39). En outre, la coccidiose cause des lésions au niveau de l'intestin qui favorisent la croissance de *C. perfringens* ainsi que l'apparition des lésions caractéristiques de l'entérite nécrotique (75). La plupart des cas d'entérite nécrotique apparaissent chez des poulets à rôtir âgés de 2 à 5 semaines. La maladie dure habituellement entre 5 à 10 jours, avec un taux de mortalité allant de 2 à 50%.

Les signes cliniques les plus courants de la maladie sont une dépression sévère, de la diarrhée, une perte d'appétit, de la difficulté à bouger et des plumes ébouriffées. Habituellement, les signes cliniques ne sont visibles que durant une courte période de temps, rarement plus de quelques heures, et les oiseaux sont souvent retrouvés morts (155).

À l'autopsie, on remarque un intestin gonflé de gaz et plus fragile. La muqueuse est recouverte, totalement ou en partie, d'une pseudomembrane dont la couleur peut varier, soit jaune, vert, brunâtre-orangé. Elle est constituée d'entérocytes de la muqueuse emprisonnés par de la fibrine. Dans les cas légers, la muqueuse est grisâtre et épaisse, il y a ensuite nécrose de la muqueuse. Dans les cas plus graves, les lésions nécrotiques sont généralisées et l'épithélium est en partie détaché (159).

Chez les modèles animaux inoculés expérimentalement, on remarque, dès la première heure après l'inoculation, un début d'œdème et la dilatation des vaisseaux sanguins de la *lamina propria*. Après 3 heures, l'œdème est plus marqué et on retrouve dans la lumière de l'intestin des cellules épithéliales détachées provenant de la pointe des villosités. Après 5 heures, les pointes des villosités sont nécrosées, ce qui amène un raccourcissement des villosités. De 8 à 12 heures après l'inoculation, les pointes sont complètement nécrosées. La nécrose commence alors à s'étendre aux cryptes. Des débris cellulaires et de la fibrine sont présents dans la lumière de l'intestin. On ne remarque toutefois aucune étape d'invasion cellulaire, ce qui laisse à penser que la bactérie n'envahit pas les cellules et que les signes cliniques sont dus aux toxines produites par la bactérie (155).

Une étude effectuée avec des mutants *plc* a démontré que la toxine alpha n'est pas nécessaire au développement de la maladie (79). Une autre étude a montré une corrélation significative entre la prolifération cellulaire de *C. perfringens* et la gravité des lésions d'entérite nécrotique, mais pas entre la production de la toxine alpha et la gravité des lésions (136).

2.2.2. Facteurs prédisposants

Les *C. perfringens* sont des habitants normaux de la flore intestinale de la volaille, donc leur seule présence dans l'intestin n'est pas la cause de la maladie. En 2003, Nauerby et son équipe (2003) ont testé par électrophorèse à champs pulsés des souches de *C. perfringens* isolées d'oiseaux sains et d'oiseaux malades. Leurs résultats ont montré que les oiseaux malades ne possédaient qu'un ou deux clones de *C. perfringens* alors que les animaux sains avaient un nombre de clones plus élevé (110) indiquant une homogénéité des souches pathogènes et une hétérogénéité des souches non-pathogènes. Cette conclusion a été depuis démontrée *in vivo* à l'aide d'un modèle animal (11). La maladie serait probablement due à une croissance exagérée d'un certain type de clone de *C. perfringens* plus pathogène (75).

Cette surcroissance de *C. perfringens* peut provenir de plusieurs facteurs. Premièrement, une muqueuse intestinale endommagée favoriserait la prolifération de *C. perfringens* et la production de toxines. Ces dommages pourraient être de cause bactérienne, ou physique. Les coccidioses causées par les pathogènes de la famille des *Eimeria* favoriseraient la croissance de *Clostridium* et l'entérite nécrotique (75, 155). Les coccidioses entraîneraient l'entrée de plasma dans la lumière de l'intestin qui serait alors une source de protéines et d'autres facteurs de croissance pour *C. perfringens*. Deuxièmement, la composition de la diète serait également un facteur de susceptibilité, car une diète riche en blé, en orge, en seigle et en avoine augmenterait le risque de développer l'entérite nécrotique chez les poulets. En 2002, l'équipe de Annett et collaborateurs a testé la prolifération du *C. perfringens* sur des milieux enrichis avec différentes céréales. La croissance fut statistiquement plus basse dans les milieux enrichis en maïs par rapport aux milieux enrichis en blé ou en seigle (6).

Selon Drew *et al.* (2004), les hauts niveaux de méthionine et de glycine contenus dans les farines de poisson favoriseraient la croissance du *C. perfringens* (44). Une diète riche en polysaccharides non digestibles constituerait également un

facteur aggravant, car ceux-ci augmentent la viscosité du contenu de l'intestin, ce qui en augmente le temps de passage. Ceci crée donc un environnement favorable à la prolifération des bactéries anaérobiques en augmentant la quantité de nutriments disponibles (159). Troisièmement, l'état de la litière qui, si trop humide ou pas assez absorbante, créerait un environnement favorable au développement de *C. perfringens*, ce qui augmenterait les risques d'entérite nécrotique (159). Finalement, un taux trop élevé d'entassement de poulets sur une même litière augmenterait également les risques (81).

2.2.3. Forme sous-clinique

La forme sous-clinique fut décrite en 1992 (76) et se distingue par la présence de lésions nécrotiques focales dans la muqueuse intestinale de certains oiseaux. La maladie ne cause pas de signes cliniques, mais la croissance est ralentie et le ratio de conversion alimentaire est diminué par rapport aux animaux sains (76). Une autre étude a toutefois montré un lien entre la prévalence de la forme sous-clinique de l'entérite nécrotique et le taux de condamnation des oiseaux à l'abattoir (92). Les facteurs prédisposants à l'infection sous-clinique ne sont pas connus, mais un modèle animal a été créé en utilisant une surdose d'un vaccin anticoccidien vivant jumelée à de multiples inoculations de *C. perfringens* (54). Ce modèle utilise des souches vaccinales de *Eimeria maxima* au lieu de souches cliniques, et les oiseaux ainsi infectés développent les lésions intestinales, mais sans les signes cliniques et la mortalité associés à la phase clinique de la maladie (54).

2.2.4. Impacts économiques

En 2000, une étude de Köhler (81) plaçait les infections à *Clostridium* spp. au 4^{ème} rang des causes de mortalité des poulets, devancées par *Escherichia coli*, les salmonelles et les staphylocoques. De 1995 à 2000, les infections à *Clostridium* spp., ont doublé d'incidence et l'agent causal principal est le *C. perfringens* de type A. En 2001, après une étude de 2,5 ans en Norvège, Lovland et Kaldhusdal montraient qu'une épidémie d'entérite nécrotique diminuait les revenus du producteur de 25 à

43%, principalement à cause d'un ratio plus faible de conversion alimentaire et d'un poids plus petit à l'abattoir (93). Dans un troupeau, la mortalité due à une épidémie d'entérite nécrotique peut atteindre 1% du troupeau par jour, et jusqu'à 30% du troupeau peut être décimé (159). Sous sa forme sous-clinique, on estime que l'entérite nécrotique coûte environ 0.05\$ par oiseau, sans compter les pertes occasionnées par la baisse du ratio de conversion alimentaire (151).

2.2.5. Traitement et contrôle

Le traitement curatif des cas d'entérite se fait à l'aide d'antibiotiques, habituellement administrés dans l'eau. La bacitracine, la pénicilline, la lincomycine et le tylosin sont les antibiotiques les plus couramment utilisés (20, 75).

Les promoteurs de croissance de nature antibiotique sont un des moyens de contrôle fréquemment utilisé en Amérique de Nord. La bacitracine, la virginiamycine et les lincosamines sont les principaux antibiotiques utilisés dans ce but (21, 75). Le contrôle de la coccidiose, un facteur prédisposant à l'entérite nécrotique, à l'aide de la narasine, un agent anticoccidien, permet également de réduire l'apparition de l'entérite nécrotique (19, 159). Les promoteurs de croissance de nature antibiotique sont interdits en Suède depuis 1986, au Danemark depuis 1995 et l'Union Européenne les a banni depuis 2006 (40). Au Danemark, l'arrêt des promoteurs de croissance de nature antibiotique a entraîné une recrudescence des cas d'entérite nécrotique et une hausse de l'usage thérapeutique des antibiotiques (58).

De nombreuses recherches ont récemment été effectuées afin d'identifier de nouveaux moyens de contrôle. Une équipe de l'Université de Guelph a identifié six protéines permettant aux poulets de développer une immunité contre une infection expérimentale (83). Trois de ces protéines permettent de protéger le poulet contre une infection expérimentale sévère (84). Selon les auteurs des études, ces protéines constituerait des cibles intéressantes pour formuler un vaccin contre l'entérite nécrotique. Une autre recherche a mis en évidence, chez les poulets qui recevaient

une diète contenant 2,5% de lactose, le développement significativement moindre de lésions intestinales suite à une infection expérimentale à *C. perfringens* (100). Des lactobacilles ont également montré une efficacité pour réduire la croissance de *C. perfringens* et constitueraient une avenue intéressante de probiotiques chez la volaille (80).

2.3. Bacitracine

2.3.1. Généralités et mode d'action

La bacitracine est un antibiotique synthétisé par *Bacillus licheniformis* et certaines souches de *Bacillus subtilis*. La synthèse se fait de façon non-ribosomale par un complexe multienzyme codée par l'opéron *bacABC* (111). La bacitracine est surtout active contre les bactéries à Gram positif, mais elle affecte également certaines bactéries à Gram négatif, comme *Escherichia coli*. La molécule (Figure 1) est instable naturellement, c'est pourquoi elle est souvent commercialisée sous forme de sel de zinc ou de méthylène disalicylate.

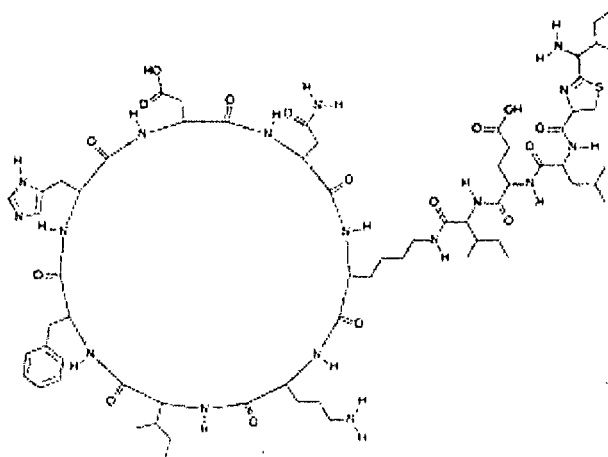
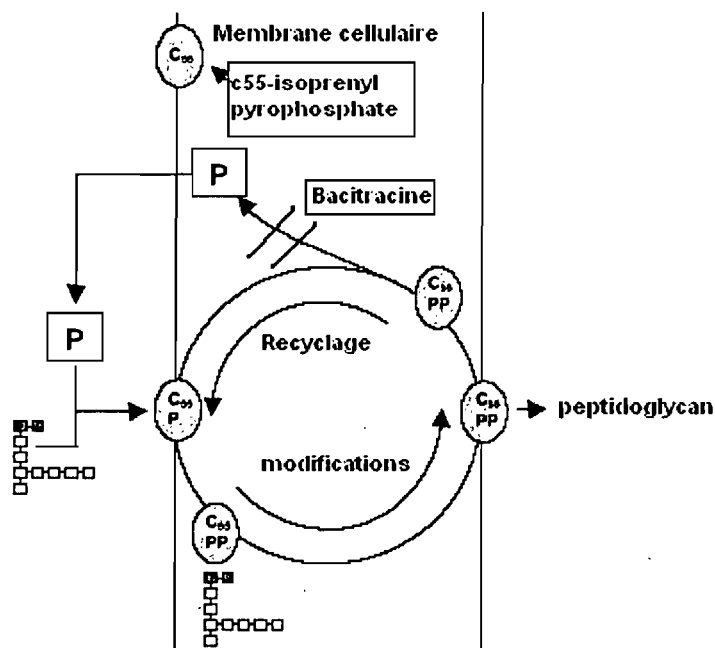


Figure 1. Molécule de bacitracine

La bacitracine agit en formant un complexe avec le C₅₅-isoprenyl pyrophosphate (IPP), un transporteur pour les monomères de peptidoglycan. La

présence du cation divalent Zn^{++} accélère la formation du complexe (113). Le complexe bloque la déphosphorylation de IPP par une phosphatase, ce qui empêche le recyclage du transporteur (Figure 2). Le manque de transporteur actif inhibe alors la synthèse de la paroi de peptidoglycan et bloque ainsi la croissance bactérienne (121).



Source : <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/roese-lars-2004-06-09/HTML/chapter1.html>

Figure 2. Mode d'action de la bacitracine

La bacitracine inhibe la synthèse de la paroi de peptidoglycan en séquestrant le c55-isoprenyl pyrophosphate qui est impliqué dans le passage des monomères de peptidoglycan à travers la membrane cellulaire.

2.3.2. Résistance à la bacitracine

2.3.2.1. Résistance phénotypique

Une étude effectuée aux États-Unis en 1997 sur les *C. perfringens* isolés de poulets et de dindes d'élevage a montré un taux élevé de résistance à la bacitracine (CMI₅₀ de 256 ug/ml) chez les isolats de poulets, mais un taux plus bas (CMI₅₀ de 8 ug/ml) chez les isolats de dindes (158). Des études tenues au Danemark et en Suède,

pays ayant cessé d'utiliser la bacitracine comme promoteur de croissance, ont montré des taux de résistance (CMI > 16 ug/ml) de 15% pour les échantillons danois et de 3% pour les échantillons suédois (74). Une étude récente ayant eu lieu au Canada a déterminé un niveau de résistance (CMI > 16 ug/ml) de 95% dans les isolats testés (31). Ces isolats avaient été obtenus d'oiseaux sains élevés dans deux fermes différentes. La première utilisait la bacitracine comme promoteur de croissance alors que la bacitracine avait été retirée de la seconde ferme. Le niveau de résistance à la bacitracine n'était pas significativement différent entre les deux fermes, mais davantage d'isolats sensibles à la bacitracine ont été retrouvés dans la ferme n'utilisant pas l'antibiotique (31).

2.3.2.2. Résistance génotypique

Il existe deux mécanismes connus de résistance à la bacitracine. Le premier est la surproduction de IPP, empêchant ainsi la bacitracine de séquestrer tout le IPP (96, 121). Les espèces productrices de bacitracine, *B. licheniformis* et *B. subtilis*, sont protégées des effets nocifs de l'antibiotique grâce au deuxième mécanisme de résistance à la bacitracine, soit la synthèse d'un système de transporteur ABC qui expulse l'antibiotique hors de la cellule. Chez *B. licheniformis*, le transporteur est composé de deux protéines hydrophobes, BcrB et BcrC, ainsi que de deux protéines identiques BcrA (120). BcrB et BcrC formeraient le canal de diffusion alors que les deux unités BcrA peuvent se lier à l'ATP et fourniraient l'énergie nécessaire au transport (120). La délétion d'une partie de *bcrA* ou de *bcrC* entraîne la perte du phénotype de résistance, alors que la perte de *bcrB* n'a pas d'effet significatif sur le niveau de résistance à la bacitracine (119). Les gènes codant pour le transporteur, *bcrA*, *bcrB*, *bcrC*, sont regroupés en un opéron. Cet opéron est sous la régulation d'un système à deux composantes, BacRS (111). La protéine BacS est une protéine histidine kinase agissant comme senseur alors que la protéine BacR est la protéine régulatrice inhibitrice. Cette résistance est intrinsèque et les gènes codant pour les protéines impliquées dans la résistance à la bacitracine sont situés sur le chromosome (111).

Chez *B. subtilis*, un transporteur ABC codé par l'opéron *bceAB* expulse l'antibiotique hors de la bactérie, la protéine BceA fournit l'énergie au système en se liant à l'ATP alors que la protéine BceB forme un canal transmembranaire (15). La protéine BcrC de *B. subtilis*, codée par le gène *bcrC*, agit comme IPP phosphatase. Elle entre en compétition avec la bacitracine pour l'IPP. Des études ont démontré que la surexpression de BcrC chez *E. coli* augmente l'activité IPP phosphatase de préparations de membrane de plus de 600 fois (14). L'opéron *bceAB* est régulé par un système à deux composantes codé par l'opéron *bceRS* (15).

Les gènes codant pour une résistance acquise à la bacitracine ont été découverts en 2004 chez des souches d'*Enterococcus faecalis* (96). La résistance est causée par un transporteur de type ABC similaire à celui de *B. licheniformis* (Figure 3). Par contre, le canal de diffusion est formé de deux protéines BcrB plutôt que d'une protéine BcrB et d'une protéine BcrC (96). Les gènes de résistance sont organisés en un opéron *bcrABD*. Cet opéron est régulé par le gène *bcrR* qui code pour une protéine jouant à la fois le rôle de senseur et de régulateur. La délétion du gène *bcrR* entraîne la disparition de la résistance à la bacitracine. La protéine BcrD a démontré une similarité avec une C₅₅-isoprenyl kinase. Manson et son équipe (96) ont montré que la délétion du gène *bcrD* n'avait aucun effet sur le niveau de résistance à la bacitracine chez *E. faecalis*. Leur étude de conjugaison a révélé que l'opéron *bcrABD* était situé sur un plasmide transférable entre des souches d'*E. faecalis*.

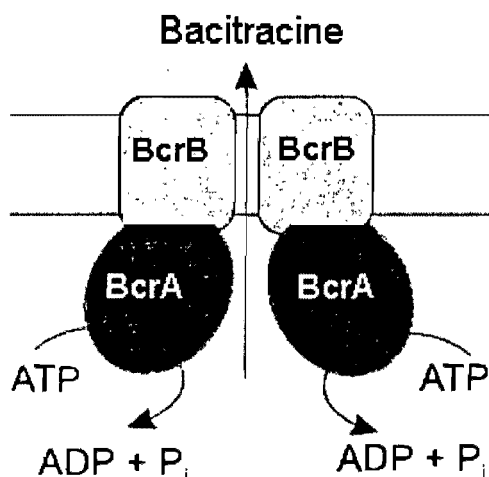


Figure 3. ABC transporteur d'*Enterococcus faecalis*

Le transporteur ABC d'*Enterococcus faecalis* est composé de 2 sous-unités BcrA, qui se lie à l'ATP et fournit l'énergie à l'ensemble et de 2 sous-unités BcrB qui forment un canal transmembranaire.

2.4. Bactériophages

2.4.1. Historique et description des bactériophages

Les premières observations portant sur l'effet des bactériophages remonte au 19^{ème} siècle. En 1896, un bactériologiste britannique du nom de Ernest Hankin a remarqué que les eaux du Gange et de la Jumna, deux fleuves de l'Inde, démontraient un effet antibactérien (147). La première véritable constatation de la nature virale des bactériophages et la première description d'un test sur plaques remonte à 1917, par Félix d'Hérelle. Il inventa également le terme bactériophage et l'associa à cette classe de microorganismes (145).

La majorité des bactériophages sont des virus composés d'un acide nucléique, ADN ou ARN, simple brin ou double brin, entouré d'une capsidie protéique. Certains peuvent être recouverts d'une couche phospholipidique appelée enveloppe, mais la plupart des bactériophages sont non-enveloppés. Ils apparaissent sous diverses formes, allant de la capsidie icosaédrique à une forme filamenteuse (67). Les phages sont séparés en 2 types selon leur capacité à s'intégrer dans le génome bactérien. Les

phages lytiques ne s'intègrent jamais dans le génome de leur hôte alors que les phages lysogéniques ont la capacité d'insérer leur génome dans le chromosome de leur hôte. Ils deviennent alors un prophage. Le prophage peut perdurer longtemps à l'intérieur de la bactérie en étant répliqué en même temps que le reste du génome de la bactérie. Il peut toutefois être activé à la suite d'un stress, et le bactériophage entre dans le cycle lytique (67).

Le cycle de réplication viral d'un bactériophage est composé de cinq étapes : adsorption du phage, pénétration du matériel génétique viral, réplication du génome viral et synthèse des composantes du virus, assemblage des virions et libération des virions suite à la lyse cellulaire (Figure 4) (122). L'adsorption à la surface bactérienne se fait par l'attachement spécifique d'un phage ou d'une de ses composantes à un récepteur situé à la surface de la membrane externe de l'hôte bactérien. L'acide nucléique viral est ensuite injecté à l'intérieur de l'hôte. La réplication du génome viral et des composantes du virion a lieu dans la bactérie en utilisant la machinerie de réplication de l'hôte. Les différentes composantes structurales s'assemblent, le matériel génétique est encapsidé et les virions sont formés. La libération des virions se fait habituellement par la lyse de l'hôte. Les virions ainsi relâchés dans le milieu peuvent ensuite aller infecter d'autres hôtes potentiels (67).

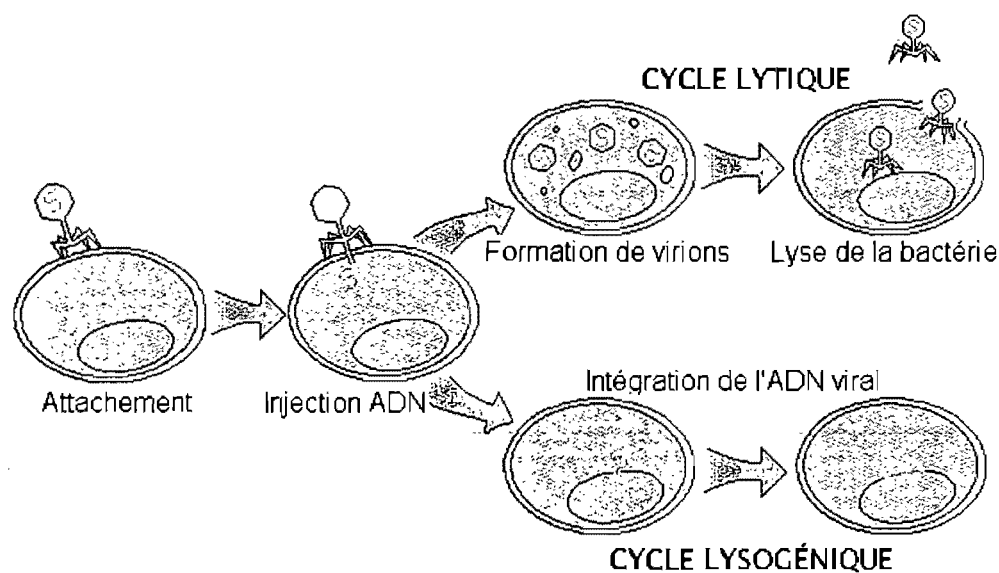


Figure 4. Cycle lytique et lysogénique d'un bactériophage

Parmi les méthodes disponibles pour l'isolement de bactériophages à partir d'échantillons cliniques ou environnementaux, deux méthodes sont davantage repertoriées dans la littérature scientifique : l'enrichissement préalable (30, 70, 115) et l'étalement direct (36, 65). L'enrichissement préalable consiste à pré-amplifier l'échantillon dans une ou plusieurs souches sensibles afin de faciliter l'isolement ultérieur alors que l'étalement direct consiste à étaler l'échantillon tel quel sur des pétris recouvert d'un tapis bactérien provenant d'une souche sensible. La filtration des échantillons varie également selon les articles, certains filtrent leurs échantillons à l'aide de filtres ayant de pores de 0,45 μm (8, 36, 115) alors que d'autres utilisent des filtres avec des pores de 0,22 μm (30, 65, 70).

Un seul phage lytique contre certaines souches de *C. perfringens* a été isolé récemment. Le phage $\Phi 3626$ a été activé à partir d'un prophage contenu dans la souche ATCC 3626 de *C. perfringens* (164). L'endolysine codée par le phage est active contre toutes les souches de *C. perfringens* qui ont été testées.

2.4.2. Classification des bactériophages

En 2007, on comptait plus de 5500 phages ayant été catégorisés (2). L'ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses) classe les bactériophages en un ordre comptant 3 familles et 17 familles distinctes. La majorité de ceux-ci (5360) sont des phages avec une capsidie icosaédrique et une queue protéique. Ils sont regroupés dans l'ordre *Caudovirales* qui est subdivisé en trois familles : *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae* (2) (Tableau II).

Tableau II : Classification des bactériophages selon l'International Committee for Taxonomy of Viruses

Famille	Exemple	Caractéristique
<i>Caudovirales</i>		Queue protéique
<i>Myoviridae</i>	T4	Queue protéique contractile
<i>Siphoviridae</i>	λ	Longue queue protéique non-contractile
<i>Podoviridae</i>	T7	Petite queue protéique
<i>Microviridae</i>	Φ X174	Polyédrique
<i>Corticoviridae</i>	PM2	Polyédrique, avec une capside complexe
<i>Tectiviridae</i>	PRD1	Polyédrique, avec une vésicule interne de lipoprotéines
Groupe SHI	SHI	Polyédrique avec une vésicule interne lipidique
Groupe STV1	STV1	Polyédrique avec des excroissances en forme de tourelle
<i>Leviviridae</i>	MS2	Polyédrique
<i>Cystoviridae</i>	Φ 6	Polyédrique, avec une enveloppe contenant des lipides
<i>Inoviridae</i>	Fd	Filaments ou bâtonnets
<i>Lipothrixviridae</i>	TTV1	Filamenteux, enveloppés
<i>Rudiviridae</i>	SIRV1	Filamenteux,
<i>Plasmaviridae</i>	L2	Pléomorphe, enveloppés
<i>Fuselloviridae</i>	SSV1	Pléomorphe, forme évasée ou en forme d'épingle
<i>Salterprovirus</i>	His1	Enveloppés, sans capside, en forme de citron
<i>Guttaviridae</i>	SNDV	Enveloppés, sans capside, en forme de goutte
<i>Ampullaviridae</i>	ABV	En forme de bouteille
<i>Bicaudaviridae</i>	ATV	Possède deux queues
<i>Globuloviridae</i>	PSV	Similaire au paramyxovirus (Enveloppé avec capside)

* : L'ordre *Caudovirales* regroupe les familles *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae*

2.4.3. Thérapie par les bactériophages

2.4.3.1. Historique de thérapie par les bactériophages

La recherche sur la thérapie par les bactériophages, ou thérapie phagique, a perdu beaucoup d'intérêt en Amérique de Nord et en Europe suite à la découverte des antibiotiques. Par contre, certaines recherches vétérinaires méritent notre attention, dont la série d'études menées sur les phages contre *E. coli* durant les années 1980 par H. Williams Smith et ses collaborateurs (160-162). Leur première étude comparait l'efficacité d'injection intramusculaire de phage anti-*E. coli* par rapport à des antibiotiques (tétracycline, ampicilline, chloramphénicol, triméthoprim, sulphafurazole et streptomycine) dans le traitement d'une infection à *E. coli* chez la vache. Leurs résultats démontrent qu'une seule injection intramusculaire de leur phage était aussi efficace que des doses multiples de streptomycine pour prévenir les décès dus à l'infection à *E. coli*. De plus, une seule dose intramusculaire de phage s'est révélée plus efficace que des doses multiples d'antibiotiques (161).

Leur seconde étude a prouvé qu'un cocktail de deux phages permettait de réduire l'apparition de résistance aux phages (voir section 2.4.3.3) par rapport à un phage utilisé seul (160). De plus, l'étude révèle avec succès la capacité d'un cocktail de différents phages à guérir une diarrhée à *E. coli* chez des veaux, des porcelets et des agneaux (160). Cette équipe a effectué un troisième essai en 1987 (162) dans lequel ils ont réussi à guérir une infection expérimentale à *E. coli* chez des veaux à l'aide d'une dose unique de phage (10^5 phages donnés oralement). L'étude démontre également une prévention d'infection en vaporisant une solution aqueuse de 10^2 bactériophages dans la pièce hébergeant les veaux (162).

Malgré l'avènement des antibiotiques, des centres de recherches sur les bactériophages situés en Pologne et en Union Soviétique ont toutefois continué leurs études sur les phages. Ces recherches ont été publiées entre 1968 et 1999 et la plupart d'entre elles sont en polonais ou en russe. La revue de littérature écrite par Sulakvelidze *et al.* (144) fournit une description détaillée de ces essais cliniques.

2.4.3.2. Essais récents de thérapie par les phages

Un résumé des expériences de thérapie par les phages sur les animaux est présenté dans le tableau III. Le phage peut être administré de plusieurs façons. La voie orale est très efficace contre les infections du tube digestif et les septicémies (42). Certains phages plus sensibles à l'acidité ont une viabilité très basse après le passage dans l'estomac. L'équipe de Ramesh (125) ont réussi à augmenter le taux de survie de leur phage en utilisant un tampon bicarbonate pour neutraliser l'acidité de l'estomac et Atterbury *et al.* (8) ont obtenu un résultat similaire en utilisant un tampon PBS contenant 30% w/v de carbonate de calcium. Une étude a également rapporté que des bactériophages pouvaient atteindre la circulation sanguine lorsque introduits par voie orale (42). Les phages peuvent également atteindre la circulation sanguine lorsque administrés par les voies intraveineuse, intrapéritonéale, intramusculaire, intranasale, intravaginale et intrautérine (42).

Différents temps d'administration des bactériophages ont été évalués dans les études de thérapie phagique. Des bactériophages utilisés de façon préventive lors de greffe de peau sur des cobayes ont empêché le développement d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* (141). Lors d'une étude effectuée en 2005, une équipe a réussi à protéger des poulets contre une infection expérimentale à *Salmonella* Typhimurium en administrant des bactériophages 7 jours avant l'inoculation par les bactéries pathogènes (148). L'administration simultanée de phages et d'agents infectieux lors d'une infection expérimentale (26, 70, 72, 97) ou l'utilisation thérapeutique de bactériophages une fois les premiers signes cliniques déclarés (12, 17) se sont également avérés efficaces. De nombreuses études (8, 27, 48, 89) ont aussi démontré la capacité des bactériophages à diminuer la colonisation du système gastro-intestinal chez les poulets par des bactéries (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter jejuni*).

La thérapie par les phages entiers n'est pas la seule avenue de recherche impliquant les bactériophages. Les endolysines, c'est-à-dire les enzymes codés et utilisés par les bactériophages pour briser la membrane bactérienne lors du

relâchement des virions, sont particulièrement intéressants en raison de leurs effets antibactériens. En 2001, l'équipe de Fischetti a démontré l'efficacité de ce type d'enzyme (90). Une endolysine provenant d'un phage infectant *Streptococcus pneumoniae* a été testée sur des souches de *S. pneumoniae* d'origine commensale et sur des souches multi-résistantes aux antibiotiques. Une baisse d'au moins un log a été observée chez chacune des souches testées (90). Des études *in vivo* à l'aide d'un modèle murin de colonisation des muqueuses ont également été effectuées. Le nombre de *S. pneumoniae* chez les animaux soumis à un traitement pharyngien à la lysine a diminué à des niveaux indétectables (0 UFC par 10 µl de lavage nasal) alors qu'il a atteint 3 log de plus chez les contrôles traités avec du tampon seulement (90).

Alors que les bactériophages ont habituellement un spectre d'hôte étroit, les endolysines de phage peuvent posséder un large spectre d'action. En 2007, l'équipe de Briers a isolé une endolysine d'un bactériophage de *Pseudomonas aeruginosa* qui a montré une activité contre *B. subtilis*, une bactérie à Gram positif (22). L'activité des endolysines touche aussi les bactéries qui sont en biofilm. Sass et Bierbaum (2007) ont isolé, d'un phage de *S. aureus*, une endolysine dont l'efficacité contre *S. aureus* n'était pas affectée par la présence de biofilms (129).

Plusieurs équipes ont isolé et caractérisé des lysines (78, 163), alors que d'autres équipes travaillent déjà à utiliser ces endolysines sur des modèles animaux (33, 49). L'équipe de Liu et al. (87) a utilisé les phages d'une manière différente; 26 phages infectant *S. aureus* ont été séquencés et ils en ont dérivé les séquences de 31 protéines affectant la croissance de l'hôte lorsque exprimées chez *S. aureus*. L'étude des cibles de ces protéines a permis de trouver des nouvelles voies d'inhibition de la réplication de l'ADN et de la transcription. Ces données pourraient être utilisées pour fabriquer de nouveaux antibiotiques en utilisant les nouveaux modes d'action découverts chez les phages (87).

Tableau III : Essais récents de thérapie phagique chez les animaux

Animal	Agent infectieux	Résultats principaux (référence)
Poulet	<i>Salmonella</i> Enteritidis <i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Salmonella</i> Hader	L'administration orale de bactériophages réduit la colonisation des intestins de poulets de 2 à 4 log selon les phages (8).
Poulet	<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4	Une inoculation simple de 10^{11} phages réduit la colonisation de poulets par <i>S. Enteritidis</i> de 3.5 log (48).
Poulet	<i>Campylobacter jejuni</i>	Le traitement aux phages a réduit la colonisation de poulets par <i>C. jejuni</i> de 0,5 à 5 log (89).
Poulet	<i>Salmonella</i> Typhimurium	L'utilisation d'un cocktail de bactériophage à titre préventif a réduit le nombre de <i>S. Typhimurium</i> chez des poulets infectés (148).
Poulet	<i>Escherichia coli</i>	Les bactériophages réduisent la mortalité due à une inoculation de <i>E. coli</i> dans le sac aérien de poulets. La protection ne se fait pas si les phages sont donnés dans l'eau (72).
Poulet	<i>Escherichia coli</i>	L'utilisation combinée de phages et d'enrofloxacin est plus efficace pour combattre l'aérosacculite chez le poulet que les deux traitements seuls (71).
Poulet	<i>Campylobacter jejuni</i>	L'administration orale de phages de façon préventive ou thérapeutique réduit la colonisation de poulets par <i>C. jejuni</i> (154).
Souris	<i>Staphylococcus aureus</i>	97% des souris sont sauvées d'une dose fatale de <i>S. aureus</i> par une injection de 10^9 UFP d'un bactériophage.(26)
Souris	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	L'administration orale de phages a permis d'obtenir un taux de survie de 66,7% contre 0% pour le groupe non-traité lors d'une infection expérimentale à <i>P. aeruginosa</i> (157).
Souris	<i>Enterococcus faecium</i> résistant à la vancomycine	Une injection de 3×10^8 UFP de phages permet de guérir toutes les souris souffrant d'une bactériémie à <i>E. faecium</i> (17).
Souris	<i>Staphylococcus aureus</i>	Une injection intra-péritonéale de phages a guéri 100% des souris d'une infection mortelle à <i>S. aureus</i> , alors que 100% des souris du groupe contrôle sont mortes (97).
Souris	<i>Escherichia coli</i>	La flore normale des souris utilisées est protégée contre l'action du phage malgré qu'elle soit constituée principalement de souches sensibles (36).
Aliments	<i>Listeria monocytogenes</i>	Un bactériophage a éradiqué la contamination d'un fromage par <i>L. monocytogenes</i> (27).

2.4.3.3. Difficultés liées à l'utilisation de phages

Malgré leurs possibilités, l'utilisation des bactériophages fait face à plusieurs problèmes qui nuisent à la mise au point de traitement à base de bactériophage. L'une de ces difficultés est la réponse du système immunitaire face aux bactériophages. En 1996, l'équipe de Merrill et collaborateurs a injecté de façon intra-péritonéale 10^{11} UFP de bactériophages à des souris. Au bout de 7 heures, le

titre dans le sang avait diminué à 10^8 UFP. Après 48 heures, le titre était de 10^2 UFP et il a atteint des niveaux indétectables après 120 heures (102). Des études antérieures avec des souris gnotobiotiques avaient permis de déterminer que les bactériophages étaient éliminés de la circulation sanguine par le système réticuloendothélial (53). Des phages contre *E. coli* et *S. Typhimurium* dont le titre dans le sang demeurait plus constant une fois injectés dans l'animal ont été obtenus. Pour ce faire, ils ont mis au point une méthode de passages en série dans l'hôte afin de sélectionner pour les variants à persistance accrue dans le système (102). Ces variants présentaient une mutation au niveau de la protéine E de la capsid qui les rendait moins susceptible d'être éliminés par le système réticuloendothélial (102). Ces phages se sont avérés aussi efficaces pour protéger les souris d'une infection expérimentale par la bactérie pathogène que les souches sauvages de phage (102).

En ce qui a trait aux interactions entre le bactériophage et le système immunitaire acquis, les rapports sont encore contradictoires. Il est rapporté que certains phages sont très bien reconnus par le système immunitaire. Le phage $\Phi X174$, par exemple, est utilisé afin de déterminer l'intensité d'une réponse immunitaire (37). L'équipe de Biswas (2002) a également testé l'immunogénicité de leur phage ENB6 et après trois injections du phage, les titres en IgG et en IgM avaient augmenté de 3800 fois et de 5 fois respectivement (17). Deux injections subséquentes n'ont pas affecté le titre des anticorps. Malgré la hausse du titre en anticorps, aucun changement physique, ni réaction anaphylactique, ni élévation de la température corporelle et autres effets négatifs, n'ont été remarqués chez les souris (17). Dans un article publié en 2003, Merril et ses collaborateurs concluent que ce ne sont pas tous les phages qui agissent comme antigènes et ceci dépendrait plutôt de la structure protéique de la capsid (103).

Une autre limite généralement reconnue est l'apparition de résistance bactérienne aux phages. Cette résistance peut s'obtenir par recombinaison d'ADN (60) ou par mutation spontanée (59, 124). Le mécanisme de résistance peut varier. Dans certains cas, la résistance aux phages se manifeste par une inhibition de l'adhésion du phage à la bactérie hôte (59, 105, 124) ou à travers un mécanisme qui interfère avec

l'injection de l'ADN viral dans l'hôte (38). Dans ses expériences de thérapie par les phages, H. Williams Smith et ses collaborateurs (160-162) ont noté l'apparition de bactéries résistants, mais celles-ci étaient moins virulentes que les souches sauvages. Ceci a été corroboré par d'autres chercheurs, dont l'équipe de Loc Carillo (89), qui évaluait l'efficacité d'un traitement par les phages pour diminuer la colonisation de poulets par *C. jejuni*. Les souches résistantes qu'ils ont obtenues ne sont jamais devenues une population dominante dans les intestins de poulets et ce, même si le traitement aux phages était encore en cours (89). Toutefois, l'équipe de Barrow (12) a obtenu des bactéries à la fois résistantes aux bactériophages et virulentes lors de leurs essais de thérapie par les phages.

La résistance aux phages peut être contournée de plusieurs façons. La méthode la plus utilisée dans la littérature consiste à administrer un cocktail de trois différents phages. Toro et ses collaborateurs (148) ont utilisé un cocktail de phages pour des études de thérapie par les phages dans le but avoué de diminuer les risques d'apparition d'une résistance. Au cours de ses études visant à déterminer le potentiel des phages à réduire la colonisation des poulets par *C. jejuni*, Wagenaar et son équipe (154) ont aussi utilisé un cocktail de phages et ont obtenu une efficacité plus élevée avec le cocktail de phages qu'avec les phages seuls. Williams Smith et ses collaborateurs (160) ont même réussi à réduire la population de bactéries résistantes à leur phage en utilisant un second phage dans leurs essais de thérapie par les phages.

Un autre problème rencontré dans l'élaboration de thérapies basées sur les phages est la très grande spécificité des bactériophages. La plupart des phages sont spécifiques à une seule espèce de bactérie, et plusieurs phages ne tuent seulement que quelques souches à l'intérieur de l'espèce (103). Cela est un avantage au niveau intestinal puisqu'on épargne la flore normale du patient, ce qui réduit les risques d'une infection par un pathogène opportuniste, comme *Clostridium difficile* (103). Toutefois, cette particularité rend difficile le traitement du patient avant que l'agent causal ne soit identifié, ce qui peut prendre entre 48 et 72 heures (123). Une façon de diminuer l'importance de cette problématique est d'utiliser des cocktails de phages

couvrant un large spectre. C'est la technique utilisée par l'équipe de Chibani-Chennoufi (36) qui, en choisissant un cocktail de 4 phages différents, a pu obtenir un effet létal maximal sur les *E. coli* entérotoxigéniques pathogènes tout en ayant le moins d'effet possible sur les *E. coli* non-pathogènes de la flore normale de la souris.

Un autre moyen utilisé pour contrecarrer la spécificité des phages est la sélection de souches à spectre large. En 2002, Biswas et ses collaborateurs (17) ont testé de nombreux phages contre un éventail de souches avant de choisir leur phage pour le traitement contre *Enterococcus faecium*. Huff et ses collaborateurs (68-72) ont procédé de la même façon pour isoler le phage qui leur a servi dans une série d'études sur l'utilisation de bactériophages contre *E. coli* pour contrôler l'aérosacculite chez le poulet.

3. Articles scientifiques

**3.1. Characterization of new genes encoding for acquired
bacitracin resistance in *Clostridium perfringens***

Characterization of new genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*

Louis-Alexandre Jalbert¹, Cindy-Love Tremblay¹, Josée Harel¹, and Marie Archambault^{1*}

¹Faculté de Médecine Vétérinaire, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP),
University of Montreal, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

*Corresponding author: Tel : [information retirée / information withdrawn] Fax: [information retirée / information withdrawn]

E-mail: [information retirée / information withdrawn]

Running title: Characterization of acquired bacitracin resistance of *Clostridium perfringens*

Abstract

Phenotypic bacitracin resistance has been reported in *Clostridium perfringens*; however, the genes responsible for the resistance have not yet been characterized. Ninety-nine *C. perfringens* isolates recovered from the normal microflora of broilers and turkeys were typed and tested for phenotypic bacitracin resistance. Toxin type A was the dominant toxin type (98%) while only few type E were recovered (2%). Twenty-six of the 99 isolates showed bacitracin resistance (MIC >16 µg/ml) and the genes encoding for this resistance were characterized in *C. perfringens* c1261_A strain. MIC₉₀ (>256 µg/ml) and MIC₅₀ (6 µg/ml) were identical for both turkey and chicken isolates. Plasmid profiling and hybridization analysis revealed that the novel bacitracin resistance genes *bcrABD* were located on a plasmid of approximately 13 kb. Sequence analysis and percentages of amino acid identity revealed a putative ABC transporter in *C. perfringens* c1261_A strain. This study reports the discovery of novel genes encoding for a putative ABC transporter associated with high-level bacitracin resistance in *C. perfringens* isolates from turkeys and broiler chickens.

Introduction

Bacitracin is a polypeptides mixture synthesized by *Bacillus licheniformis* and some strains of *Bacillus subtilis*. It inhibits the cell wall synthesis by binding to the undecaprenyl pyrophosphate (UPP) and preventing its dephosphorylation, therefore blocking the recycling of UPP in undecaprenol monophosphate (UP), a lipid carrier implicated in the transport of peptidoglycan monomer units through the cytoplasmic membrane (31, 32). In humans, bacitracin can be used topically and has been proposed as an oral drug for the control of vancomycin-resistant enterococci (24). In the poultry industry, bacitracin is used for prophylaxis, therapy and as a growth promoter in some countries (26).

The most efficient mechanism of resistance to bacitracin is an ABC transporter which is responsible for the export of the bacitracin out of the bacteria. Such a transporter has been identified in *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* (5, 19, 23, 27, 33). In *E. faecalis*, the genes encoding for the ABC transporter are located on a transferable plasmid (19) while the location is chromosomal in the other three species (5, 23, 27, 33).

Clostridium perfringens has been ranked by the Center for Disease Control (CDC) as one of the most common bacterial causes of food-borne illness in the United States (21). *C. perfringens* is also associated with necrotic enteritis in poultry and enterotoxemia in many other animal species (29). Isolates of animal origin constitute a risk for transmission to humans through the food chain. This pathogen is also classified as a class-B bioterrorism agent by the CDC because of its epsilon toxin. The virulence of *C. perfringens* is largely due to its toxin-producing abilities. To date, 17 *C. perfringens* toxins have been reported

(29); however, each individual *C. perfringens* isolate produces only a subset of these toxins. A classification based on the production of four major toxins (alpha, beta, epsilon, and iota) divides the *C. perfringens* into five toxigenic types (A to E). Other toxins, like β 2- or enterotoxin, are found in several toxigenic types and may contribute to disease (29). For the past two decades, at least 10-20 human outbreaks have been reported annually in the U.S., and it is probable that many of them go unreported because samples are not tested routinely. CDC estimates that about 10,000 actual cases occur annually in the U.S.

Clostridium perfringens studies on bacitracin resistance in North America have shown high level of phenotypic resistance in isolates of poultry origin (7, 36). However, the genes responsible for the resistance have not yet been identified. In this study, we report the discovery of novel genes encoding for a putative ABC transporter and a regulatory protein associated with high-level of bacitracin resistance in *C. perfringens* isolates from turkeys and broiler chickens.

Materials and methods

Bacterial isolates

A total of 99 isolates of *Clostridium perfringens* were recovered from chicken and turkey caeca taken in 5 processing plants (4 chickens and 1 turkey) located in the province of Quebec, Canada. The contents of the caeca were cultured in cooked meat broth (PML, Québec, Canada) for 48 hours in anaerobic conditions at 35°C. Ten µl were then plated on anaerobic blood agar supplemented with gentamicin (PML) and incubated for 24 hours under anaerobic conditions. Colonies with a typical double zone of hemolysis were subcultured for purity on blood agar. Gram staining was performed on every isolate and cultures with Gram-positive square-ended rods were selected for PCR identification and genotyping.

PCR identification and genotyping

Identification and genotyping was performed with a multiplex PCR that allows the detection of the toxins genes *cpa* (alpha), *cpb* (beta), *etx* (epsilon), *iA* (iota), *cpb2* (β2- toxin) and *cpe* (enterotoxin) of *C. perfringens*. Primers and conditions were used as previously described (10) with slight modifications to allow smaller sample and reaction volumes. Briefly, DNA extraction was performed with the Chelex 100 (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) ebullition method where many loops of pure colonies of our isolates were mixed with 10% Chelex then boiled for twenty minutes (35). The supernatant contains the DNA used for the multiplex PCR. Each PCR reaction was constituted of: 2.5 µl of 10X PCR Buffer (Amersham Biosciences, Québec, Canada), 1.5 U of Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences, Québec, Canada) and primer sets for *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe*, and *cpb2*. DNA

amplification reactions were carried out using a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc, Québec, Canada) with the following 35 cycles of 20 sec at 94°C, 20 sec at 55°C and 40 sec at 72°C with a hot start of 5 min at 94°C and a final elongation time of 5 min at 72°C. For visualization of PCR products, 5 µl of the amplicon were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide. A ladder 100 bp (TrackIt, Invitrogen, Ontario, Canada) was used as the marker. *C. perfringens* type E with the enterotoxin gene (*cpe*) (AHL#155, positive for *cpa*, *iA*, *cpe* and *cpb2* genes) and *C. perfringens* type B (AHL#156, positive for *cpa*, *cpb* and *etx* genes) were used as positive controls (7).

Bacitracin susceptibility testing

Phenotypic bacitracin minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the Etest (AB BIODISK, Solna, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Preliminary tests indicated that an inoculum size of 10^5 CFU/ml allowed the growth of a lawn of well-developed colonies and an easily permitted discernment of growth inhibition by bacitracin. Consequently, an inoculum of 10^5 CFU/ml was used for evaluation of bacitracin susceptibilities. Stock cultures were thawed on blood agar plate and incubated for 24 h in anaerobic conditions. Colonies were randomly selected, combined and then diluted in brucella broth to yield concentrations of 10^5 CFU/ml. *C. perfringens* suspensions were spread with a cotton swab on a brucella blood agar plate. After the surface of the inoculated plate had completely dried, a bacitracin Etest strip was placed on the surface according to the manufacturer's instructions. Agar plates were then incubated at 35°C in anaerobic conditions for 48h with a first reading at 24h and a second reading at 48h. At both times, colonies could be detected and MICs were read by determining where the zone of growth

inhibition intersected the MIC scale on the strip. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used as quality control. The concentrations that inhibit growth of at least 50% and 90% of the isolates tested were calculated as MIC₅₀ and MIC₉₀, respectively.

Detection of bacitracin resistance genes and sequencing

The *bcr* operon sequencing was performed on a bacitracin resistant *C. perfringens* strain c_1261A isolated from a turkey ceacum using the primer walking technique. Primers for the *bcrR* and *bcrB* genes (Table 1) were both designed based on the *Enterococcus faecalis* sequences of these genes (19). Both *bcrR* and *bcrB* genes were detected by PCR (Biometra) in *C. perfringens* strain c_1261A. Amplicons were purified by Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Mississauga, Canada), sequenced on an ABI PRISM 310 (Applied Biosystems), and results were used for primer walking. Briefly, the targeted sequences were further divided in different section steps for which primer pairs were designed for PCR and sequencing (Table 1). Each section was amplified using a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc, Québec, Canada) with the following 35 cycles of 10 sec. at 94°C, 10 sec. at 50°C and 30 sec. at 72°C with a hot start of 5 min at 94°C and a final elongation time of 5 min at 72°C; and each amplicons were purified and sequenced. Sequence alignment was performed using BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences) and sequence analysis was done with the programs BLASTN and BLASP (National Center for Biotechnology Information, Los Alamos, New Mexico). The GeneMark.hmm software was used to locate the gene boundaries (18).

Plasmid analysis

Plasmid DNA of the bacitracin resistant *C. perfringens* strain c_1261A was purified by an

alkaline lysis method using a plasmid midi-kit (Qiagen, Mississauga, Canada) with the addition of 5 µg/ml of lysosyme in the resuspension buffer before incubation at 35°C for 30 min. The plasmid DNA was visualized on a 1% agarose gel after an electrophoresis of 40 min at 100 V/cm. The plasmid bands sizes were determined using the software 1Dscan EX 3.01 (BD Biosciences Bioluminescence) of the Gel Doc 2000 (Bio Rad, Mississauga, Canada) by reference to plasmids of known band sizes (Bac-Tracker Supercoiled DNA ladder, Epicentre Biotechnologies).

Southern hybridization analysis

The plasmid DNA was transferred to positively charged nylon membranes (Roche Diagnostics) using a Vacuum Blotter Model 785 (Bio-Rad, Mississauga, Canada). Amplicons of *bcrR* and *bcrB* genes were used as hybridization probes. The PCR products were labelled with 50 µCi deoxycytidine 5'-triphosphate (alpha-32P) (PerkinElmer, Waltham, Canada) using Ready-To-Go DNA labelling beads (GE Healthcare, Mississauga, Canada) according to the manufacturer's instructions. The hybridization was performed as previously described (11) with slight modifications. The nylon membranes were placed in the hybridization buffer (3X SSC, 10X Denhart solution, 1% heat-denatured DNA sodium salt from salmon testes and 0,01% SDS) for 2h at 65°C under constant agitation. The membranes were then transferred into fresh hybridization solution containing the heat-denatured, labelled probe. The hybridization was performed overnight at 65°C under agitation, and then the membranes were washed three times with a washing solution (3X SSC and 0,1% SDS) at 65°C for 30 min. The membranes were air-dried and placed on a X-ray film (Bioflex® Econo Film, Clonex corporation) at -80°C for 24 hours before development.

Results

C. perfringens genotyping

Ninety-nine field isolates of *C. perfringens* were recovered from the caeca of turkeys (81 isolates) and chickens (18 isolates). Isolation rates of *C. perfringens* from caeca samples were 66% for turkeys and 30% for broilers. Of those 99 field isolates, genotyping results revealed that 96 were of type A (alpha toxin) and 3 were of type E (alpha and iota toxins). The *cpb2* gene (β 2- toxin) was observed in 11 isolates, while the *cpe* gene (enterotoxin) was not recovered. Figure 1 illustrates the different genotypes observed in this study.

Bacitracin resistance

Of the 99 field isolates of *C. perfringens*, 26 of those showed bacitracin resistance (19 and 7 of turkey and chicken origin, respectively); while the remaining 73 isolates were susceptible to bacitracin with MICs ranging from 0.75 μ g/ml to 16 μ g/ml (Table 2). The resistant isolates demonstrated high level of resistance to bacitracin by their elevated MIC results ($> 256 \mu$ g/ml). *C. perfringens* chicken isolates showed higher bacitracin resistance (38.9%) compared to the ones observed in turkey isolates (23.5%). MIC₉₀ was calculated at $> 256 \mu$ g/ml and MIC₅₀ was calculated at 6 μ g/ml for both turkey and chicken *C. perfringens* isolates. Bacitracin resistance breakpoint was set at $>16 \mu$ g/ml according to a previous study by Chalmers *et al* (7).

Sequence analysis

Putative bacitracin resistance genes were sequenced using PCR amplification with walking primers. The primers were designed based on the sequence of the *E. faecalis* *bcrABD*

operon. With the use of the GeneMark.hmm software program, it was found that the putative bacitracin resistance genes were contiguous on a DNA fragment of 4486 pb with four open reading frames (ORFs) that were oriented in the same direction and were designated *bcrR* (621 pb), *bcrA* (702 pb), *bcrB* (527 pb), and *bcrD* (740 pb) based on sequence homology with bacitracin resistance genes identified in *E. faecalis* (19) (Fig. 2). Using BLASTN, the complete DNA fragment showed 88% nucleotides homology to the *E. faecalis* plasmid PJM01.

The *bcrD* gene encodes for a putative 245 amino acid protein with an estimated molecular weight of 27 kDa. The amino acid sequence of BcrD was found to have 86% identity and 91% similarity to the BcrD protein discovered in *E. faecalis* which is a putative undecaprenol kinase implicated in bacitracin resistance (4, 12). Identities between 60 % and 75 % with undecaprenol pyrophosphate phosphatase of *Eubacterium ventriosum*, *Coprococcus eutactus*, and *Clostridium thermocellum* were also found for the BcrD protein of *C. perfringens* c1261_A. BcrB, a 175 amino acid putative protein with an estimated molecular weight of 19 kDa, shared 83% identity and 87% similarity to the *E. faecalis* BcrB protein with a membrane-spanning domain. BcrB also showed identity (between 35% and 40%) to a number of permeases associated with ABC transporters. BcrA is a 233 amino acid putative protein with an estimated molecular weight of 26 kDa. It has 62% identity and 72% similarity to the *E. faecalis* BcrA protein with an ATP-binding domain and also showed identity (between 40% and 45%) to other ATP binding proteins of ABC transporters. The complete amino acid sequences of BcrA and BcrB are predicted to be a homodimeric ABC transporter similar to the one recently described by Manson *et al.* (2004). The complete 206 amino acid sequence of BcrR contained a xenobiotic response element (XRE) conserved

domain of the transcriptional regulators family from residue 2 to residue 55. BcrR shared 69% identity and 80% similarity to *E. faecalis* BcrR which is suspected to act as a sensor and a transducer of bacitracin availability and its molecular weight is estimated at 23 kDa.

Plasmid and hybridization analysis

Plasmid extraction and analysis of *C. perfringens* isolate c1261_A showed 6 bands with molecular weights of approximately 3kb, 3.5kb, 6kb, 7.5kb, 13kb and 90 kb (Fig. 3A). Southern blotting and hybridization experiments with *bcrB* and *bcrR* probes showed hybridization between these probes and only one band corresponding to a 13kb plasmid band (Fig. 3B and 3C). Control experiments showed no cross-hybridization between probes (results not shown).

Discussion

While bacitracin resistance has been reported in the past in *C. perfringens*, no genes have been associated with the resistance (7, 36). A culture collection of *C. perfringens* originating from turkey and chicken intestinal tracts was set up and each isolate were typed before their susceptibilities to bacitracin were determined. Ninety-nine field isolates of *C. perfringens* were recovered from the caeca of turkeys (81) and chickens (18). Isolation rates of *C. perfringens* from caeca samples were 66% for turkeys and 30% for broilers. Our *C. perfringens* isolation rates were higher for turkeys than for chicken isolates. This is in agreement with a previous study (7) which demonstrated that *C. perfringens* isolation was more difficult after the chickens reached 22 days of age due to modifications of their intestinal flora. The fact that some birds might have been fed a bacitracin supplemented diet could have contributed to a lower isolation rate, as it has been proved that bacitracin reduces the count of *C. perfringens* in the caeca of the treated birds (9). Most of the isolates recovered in our study were of type A, which is also concordant with data previously published (7, 30). No *cpe* genes, encoding for the enterotoxin, were found in this study and previous work has shown that fewer than 5% of *C. perfringens* isolates harbour the *cpe* gene (15, 20, 34). Recently, Crespo *et al.* (8) found only one isolate out of 31 *C. perfringens* isolates that had the enterotoxin gene while Chalmers *et al.* (7) found no *cpe* gene in their study where they investigated 298 isolates of *C. perfringens* from chickens.

The phenotypic bacitracin resistance level of the poultry isolates was 26% which is lower than the one that has been reported by others that looked at Canadian isolates of *C. perfringens* (7). Based on broth microdilution MIC distributions, the previously reported study (7) revealed 95% bacitracin resistance with a 16 µg/ml breakpoint in *C. perfringens*

isolates. Differences between results can be explained by the type of method used to determine the MICs. In fact, Benning and Mathers (3) have shown a difference between the agar dilution method and the broth microdilution method in testing for antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* to bacitracin and tylosin. This difference can reach 2 dilutions for bacitracin. They concluded that the agar dilution method was preferable over the broth dilution method for bacitracin susceptibility testing for *C. perfringens* (3). The Etest method we used is more similar to the agar dilution test than the broth microdilution method; therefore it can explain the differences in results observed between the two studies.

In order to elucidate the genetic basis for bacitracin resistance in *C. perfringens*, we chose to study the bacitracin resistant (MIC >256 µg/ml) *C. perfringens* strain c_1261A of poultry origin recovered in this study. We report here for the first time the identification and characterization of novel genes associated with bacitracin resistance in *C. perfringens*. The high level of amino acid homology between the products encoded by the novel genes and proteins implicated in ABC transporter suggest that the novel genes identified in this study encode for an ABC transporter. This is further consolidated by the high level of bacitracin MICs (>256 µg/ml) observed in the resistant isolates recovered in this study. Reports in the literature suggest that the level of bacitracin resistance given by the ABC transporter is higher than the one given by any other mechanisms (4, 5), such as overproduction of UP kinase (6) or the overproduction of UPP phosphatase (5, 12).

The putative ABC transporter identified in this study seems genetically closer to the acquired plasmid-borne ABC transporter described by Manson *et al.* (19) in *E. faecalis* than the ABC transporters described for *B. licheniformis*, *B. subtilis* and *S. mutans* (5, 23, 33).

Like the *E. faecalis* ABC transporter, the *C. perfringens* c1261_A putative transporter is located on a plasmid and is potentially regulated by a single protein which contains a XRE domain with homology to the *E. faecalis* regulator, BcrR. In all other bacitracin efflux ABC transporters described to date, such as *B. licheniformis* and *B. subtilis*, regulation is performed by a two-component system of a sensor kinase and a response regulator localized on an operon on the chromosome. The XRE family of transcriptional regulators contains regulators involved in stress responses in bacteria (17) as well as in bacitracin resistance in *E. faecalis* (19). However, there are some differences between the two sets of genes. The *C. perfringens* *bcrB* and *bcrA* are smaller than their *E. faecalis* counterparts (*bcrB* is 220 bp shorter and *bcrA* is 225 bp shorter). The distance between the *bcrA* and the *bcrB* genes is larger in *C. perfringens* (441 bp versus -7 bp in *E. faecalis*).

Plasmid and hybridization analysis were used to further investigate the location of the *bcrB* and *bcrR* genes. Both *bcr* probes hybridized to a band of approximately 13 kb, demonstrating that the *bcr* genes are plasmid borne in the *C. perfringens* cc1261_A. In all other bacterial genera, except for *E. faecalis* (19), bacitracin were found to be encoded by the chromosome (5, 23, 33). In *C. perfringens*, plasmids have been associated with toxins production (13, 25) and antibiotic resistance, mainly tetracycline (1, 2). The β -, β 2-, ϵ - and ι -toxins are known to be localized on large plasmids (55-140 kb) (14, 16, 25). The *tcp* region of the pCW3 plasmid associated with tetracycline resistance was shown to be essential for the conjugative transfer of the plasmid (2). This locus has been identified in CPE plasmids and β -, ϵ - and ι - plasmids (2, 22, 28). The *E. faecalis* *bcrABD* operon has been shown to be present on a conjugative plasmid (19). It is possible that the new *C. perfringens* *bcrA*, *B*, *D* and *R* genes could be transferable by conjugation to bacitracin sensitive *C. perfringens*.

isolates but this hypothesis demands further investigations.

In conclusion, in this study, we report for the first time the identification and characterization of genes associated with acquired bacitracin resistance in *C. perfringens* strain cc_1261A of poultry origin. Zinc bacitracin is used in North American poultry production. The use of this compound has likely selected for *C. perfringens* strains encoding for bacitracin resistance genes. The fact that transferable bacitracin resistance genes have been described in *E. faecalis* and that these genes have high homologies with the novel genes described in this study, we speculate a common origin for the bacitracin resistance genes between the two genera. Further investigations are needed to determine the role of each gene, their transferability and how widespread these genes are in *Clostridium* strains and species from different origins.

Acknowledgements

This work was funded by the Poultry Industry Council (PIC) of Canada. We would like to thank Drs. Martine Boulianne, Ann Letellier and Sylvain Quessy for the poultry caeca sample collection, Guy Fontaine for the help with sequences analysis and Dr. Gregory Cook, Alexandre Thibodeau and Dr. Hugh Cai for providing control strains for this study.

Table 1. Primers for sequencing novel bacitracin resistant genes of *C. perfringens* strain c1261_A using the primer walking method.

Steps	Primers sequences 5' – 3'	Locations	Size of products
1			
Forward	TACCGTTGGGTGCAAGAATACGGA	26-60	1030 pb
Reverse	ATAGGAGTTTCACGAGTGGCAGCA	1031-1055	
2			
Forward	CCATGCCAATGACAAGTGTGAGCA	941-965	543 pb
Reverse	AGGGCATATGCTTCTTGTGGACGA	1459-1483	
3			
Forward	ACACAAGCTACCGCAACCTTGAAC	1341-1364	434 pb
Reverse	TCTGCCGTGATTGTCATGGGAAGT	1750-1774	
4			
Forward	AAAGAAACCGACTGCTGATA	1622-1641	489 pb
Reverse	GCTTACTTGTATAGCAGAGA	2091-2110	
5			
Forward	ACAGCGTCATATAGCCCACAAACG	2016-2040	340 pb
Reverse	TCAAACGTATTGGAGGTGGCGGT	2331-2355	
6			
Forward	CAGTACGCTGTCGCTGTATA	2156-2175	1232 pb
Reverse	CTGACACGATAAGTGTGCGGA	3368-3387	
7			
Forward	CCGTTTCTGCCGAGCAAACCATAA	3213-3237	308 pb
Reverse	GCACAAGGGATAGCGAAACTGATG	3496-3520	
8			
Forward	TATAGGGTTCTCTTGCCGCT	3488-3507	426 pb
Reverse	GTTACCCTAACATGGAGTCG	3894-3913	
9			
Forward	AGTTCTTCGCCCAGATAGCAGTCAT	3905-3929	276 pb
Reverse	GGGCATATCGGAAAGACGGATACA	4156-4180	
10			
Forward	GTAACCCTTGCCGCTTCCCATTT	3987-4011	526 pb
Reverse	AGAACCATAATAGAGCGTGGCGT	4488-4512	

Table 2. MIC₅₀, MIC₉₀ and percentages of bacitracin resistance build on MIC distributions of *C. perfringens* isolates from turkeys and chicken broilers.

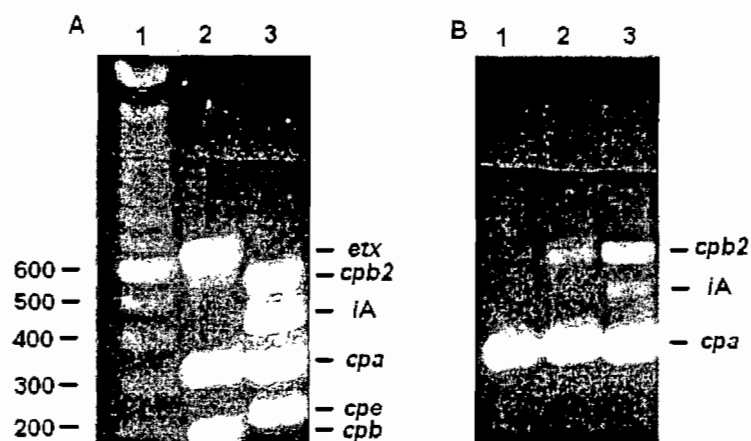
Origin ^(a)	Number of isolates with a MIC (µg/ml) of										MIC ₉₀ ^b and MIC ₅₀ ^b (µg/ml)
	0.75	1	2	3	4	6	8	12	16	> 256	
Turkey (81)			12	16	10	11	3	7	3	19	> 256 6
Chicken (18)	1		5	1	1	1	1	1		7	> 256 6

^a Numbers of isolates

^b Indicates the concentration where growth is inhibited in 50% and 90% of the strains.

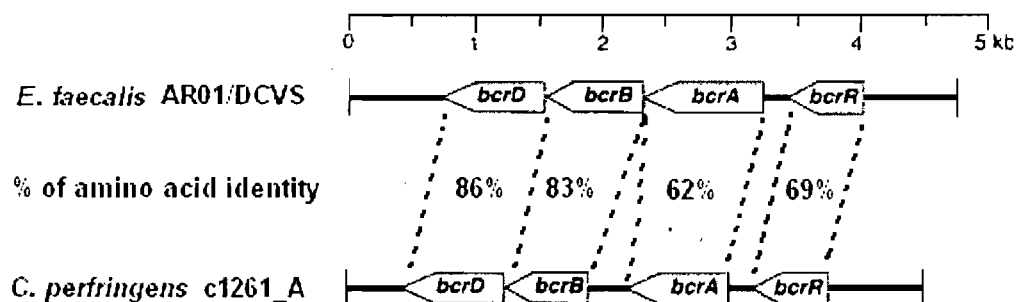
The vertical line indicates the bacitracin breakpoint of 16 µg/ml.

Figure 1. Representative genotypes of *C. perfringens* recovered in this study.



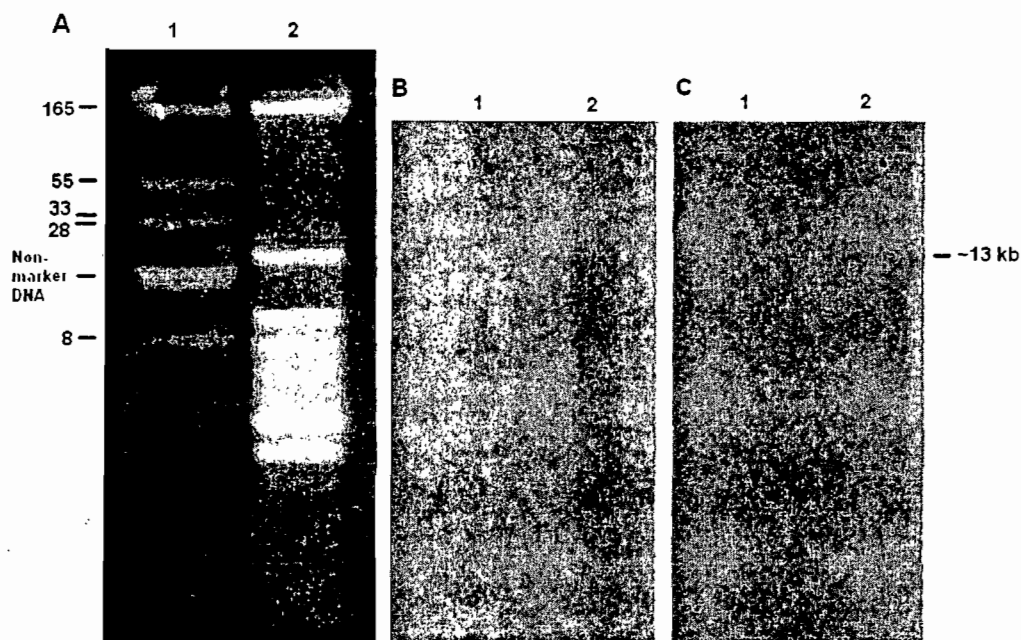
Agarose gel of *C. perfringens* PCR genotyping. (A) Lane 1, molecular size standard (in pair of bases, Invitrogen); lane 2, *C. perfringens* control AHL #156 strain (genes *cpa*, *cpb* and *etx*); lane 3, *C. perfringens* control AHL #155 strain (genes *cpa*, *cpb2*, *iA* and *cpe*). (B) Lane 1, *C. perfringens* type A isolate; lane 2, *C. perfringens* type A *cpb2* positive; lane 3, *C. perfringens* type E *cpb2* positive.

Figure 2. Comparison between *Enterococcus faecalis* operon *bcrABD* and *C. perfringens* putative operon *bcrABD*.



Organization of *C. perfringens* c1261_A resistance genes *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, and *bcrR* and comparison with *bcrABD* operon of *E. faecalis* ARO1/DCVS. Open arrows indicates ORFs. The amino acid percentages indicated relate to the identity between the amino acid sequences of the proteins encoded by the ORFs between the two operons.

Figure 3. Plasmid profiling and hybridization of undigested plasmid DNA of the bacitracin resistant *C. perfringens* strain c1261_A.



Agarose gel of *C. perfringens* strain c1261_A plasmids (A). Southern blot of *C. perfringens* isolate c1261_A plasmids probed with *bcrB* (B). Southern blot of *C. perfringens* isolate c1261_A plasmids probed with *bcrR* (C). Lane 1, molecular weight standard (in kilobases, Epicentre biotechnologies); Lane 2, *C. perfringens* isolate c1261_A plasmids. Sizes (in kilobases) are indicated on the left.

References

1. **Abraham, L. J., and J. I. Rood.** 1985. Molecular analysis of transferable tetracycline resistance plasmids from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **161**:636-40.
2. **Bannam, T. L., W. L. Teng, D. Bulach, D. Lyras, and J. I. Rood.** 2006. Functional identification of conjugation and replication regions of the tetracycline resistance plasmid pCW3 from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **188**:4942-51.
3. **Benning, V. R., and J. J. Mathers.** 1999. Comparison of Agar Dilution and Broth Microdilution Methods of Anaerobic Antimicrobial Susceptibility Testing using Several Veterinary Antibiotics against *Clostridium perfringens* Strains Originating from Porcine and Avian Sources. *Anaerobe* **5**:561-569.
4. **Bernard, R., M. El Ghachi, D. Mengin-Lecreulx, M. Chippaux, and F. Denizot.** 2005. BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem* **280**:28852-7.
5. **Bernard, R., P. Joseph, A. Guiseppi, M. Chippaux, and F. Denizot.** 2003. YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **228**:93-7.
6. **Cain, B. D., P. J. Norton, W. Eubanks, H. S. Nick, and C. M. Allen.** 1993. Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:3784-9.
7. **Chalmers, G., S. W. Martin, D. B. Hunter, J. F. Prescott, L. J. Weber, and P. Boerlin.** 2007. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol*.
8. **Crespo, R., D. J. Fisher, H. L. Shivaprasad, M. E. Fernandez-Miyakawa, and F. A. Uzal.** 2007. Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. *J Vet Diagn Invest* **19**:329-33.
9. **Engberg, R. M., M. S. Hedemann, T. D. Leser, and B. B. Jensen.** 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poult Sci* **79**:1311-9.
10. **Garmory, H. S., N. Chanter, N. P. French, D. Bueschel, J. G. Songer, and R. W. Titball.** 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect* **124**:61-7.
11. **Harel, J., H. Lapointe, A. Fallara, L. A. Lortie, M. Bigras-Poulin, S. Lariviere, and J. M. Fairbrother.** 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**:745-52.
12. **Harel, Y. M., A. Bailone, and E. Bibi.** 1999. Resistance to bacitracin as modulated by an *Escherichia coli* homologue of the bacitracin ABC transporter BcrC subunit from *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol* **181**:6176-8.
13. **Hughes, M. L., R. Poon, V. Adams, S. Sayeed, J. Saputo, F. A. Uzal, B. A. McClane, and J. I. Rood.** 2007. Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative. *J Bacteriol* **189**:7531-8.
14. **Katayama, S., B. Dupuy, G. Daube, B. China, and S. T. Cole.** 1996. Genome mapping of *Clostridium perfringens* strains with I-CeuI shows many virulence genes to be plasmid-borne. *Mol Gen Genet* **251**:720-6.
15. **Kokai-Kun, J. F., J. G. Songer, J. R. Czczulin, F. Chen, and B. A. McClane.** 1994. Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. *J*

- Clin Microbiol 32:2533-9.
16. **Li, J., K. Miyamoto, and B. A. McClane.** 2007. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infect Immun* 75:1811-9.
 17. **Liu, Y., J. Zhou, M. V. Omelchenko, A. S. Beliaev, A. Venkateswaran, J. Stair, L. Wu, D. K. Thompson, D. Xu, I. B. Rogozin, E. K. Gaidamakova, M. Zhai, K. S. Makarova, E. V. Koonin, and M. J. Daly.** 2003. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4191-6.
 18. **Lukashin, A. V., and M. Borodovsky.** 1998. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res* 26:1107-15.
 19. **Manson, J. M., S. Keis, J. M. Smith, and G. M. Cook.** 2004. Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3743-8.
 20. **McClane, B. A.** 1996. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon* 34:1335-43.
 21. **Mead, P., L. Slutsker, V. Dietz, L. McCaig, J. Bresee, C. Shapiro, P. Griffin, and R. Tauxe.** 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607-25.
 22. **Miyamoto, K., D. J. Fisher, J. Li, S. Sayeed, S. Akimoto, and B. A. McClane.** 2006. Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J Bacteriol* 188:1585-98.
 23. **Neumuller, A. M., D. Konz, and M. A. Marahiel.** 2001. The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem* 268:3180-9.
 24. **O'Donovan, C. A., P. Fan-Havard, F. T. Tecson-Tumang, S. M. Smith, and R. H. Eng.** 1994. Enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with oral bacitracin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 18:105-9.
 25. **Petit, L., M. Gibert, and M. R. Popoff.** 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 7:104-110.
 26. **Phillips, I.** 1999. The use of bacitracin as a growth promoter in animals produces no risk to human health. *J Antimicrob Chemother* 44:725-8.
 27. **Podlesek, Z., A. Comino, B. Herzog-Velikonja, and M. Grabnar.** 2000. The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol Lett* 188:103-6.
 28. **Sayeed, S., J. Li, and B. A. McClane.** 2007. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infect Immun* 75:2391-8.
 29. **Songer, J. G.** 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 9:216-34.
 30. **Songer, J. G.** 1996. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. *Clinical Microbiology Reviews* 9:216-234.
 31. **Stone, K. J., and J. L. Strominger.** 1972. Inhibition of sterol biosynthesis by bacitracin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1287-9.
 32. **Stone, K. J., and J. L. Strominger.** 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:3223-7.
 33. **Tsuda, H., Y. Yamashita, Y. Shibata, Y. Nakano, and T. Koga.** 2002. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents*

- Chemother **46**:3756-64.
34. **Van Damme-Jongsten, M., K. Wernars, and S. Notermans.** 1989. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie Van Leeuwenhoek* **56**:181-90.
 35. **Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi.** 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**:506-13.
 36. **Watkins, K. L., T. R. Shryock, R. N. Dearth, and Y. M. Saif.** 1997. In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet Microbiol* **54**:195-200.

Contribution des auteurs à l'article 3.1

Louis-Alexandre Jalbert : a effectué toutes les manipulations à l'exception du marquage radioactifs des sondes et de certaines hybridations et il a écrit le manuscrit dans sa totalité.

Cindy-Love Tremblay : a procédé au marquage radioactif des sondes ainsi qu'à certaines hybridations.

Josée Harel : a participé au bon déroulement des expériences par un suivi critique et a participé à la correction du manuscrit.

Marie Archambault : a supervisé les travaux de Louis-Alexandre Jalbert et de Cindy-Love Tremblay ainsi que la rédaction du manuscrit.

**3.2. *In vitro* determination of lytic potential of two new
bacteriophages against *Clostridium perfringens***

In vitro determination of lytic potential of two new bacteriophages against *Clostridium*
perfringens

Louis-Alexandre Jalbert¹, Ann Letellier¹, Sylvain Quessy¹, Josée Harel¹, and Marie
Archambault^{1*}

¹Faculté de Médecine Vétérinaire, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP),
University of Montreal, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

To be submitted to Poultry Science

*Corresponding author: Tel : [information retirée / information withdrawn] Fax: [information retirée /
information withdrawn]

E-mail: [information retirée / information withdrawn]

Running title: Lytic potential of new phages of *Clostridium perfringens*

Abstract

Clostridium perfringens can be a pathogen as well as an inhabitant of the normal intestinal flora in both humans and animals. In this study, 156 *C. perfringens* isolates were collected from chicken and turkey caeca. Multiplex PCR toxin typing revealed a majority of *C. perfringens* type A isolates (96%), some type C (0.6%) and type E (3.2%). The *cpb2* gene, encoding for the beta2 toxin, was detected in 20 isolates (12.8%) while no *cpe* gene, encoding for the CPE enterotoxin, was detected. Two bacteriophages, phage Φ 2084 and phage Φ 2450, with *in vitro* lytic activity against *C. perfringens* poultry isolates were recovered from wooden litter and chicken intestinal tract. Out of 156 *C. perfringens* isolates, phage Φ 2084 lysed 25 isolates (16%) while phage Φ 2450 lysed 33 isolates (21%). A cocktail made of these two bacteriophages with the previously characterized bacteriophage Φ 3626 was able to lyse 55 isolates (35%). Electronic transmission microscopy experiments revealed that the phage Φ 2084 belongs to the *Siphoviridae* family of the *Caudovirales* order. This is, to our knowledge, the first report on a bacteriophage cocktail against *C. perfringens*.

Introduction

Bacteriophages are prokaryotic viruses that cannot invade eukaryotic cells. They are ubiquitous in the environment. Lytic bacteriophages have been tested as therapeutic or prophylaxis agents for treating bacterial infection in chickens (9, 17). They infect the host bacteria, multiply inside the cell and lyse it to release new viruses. In order to maximize efficiency and to reduce risks of development of bacteriophages resistance, several different phages can be mixed and used as a cocktail (9, 17, 20).

Clostridium perfringens is associated with necrotic enteritis in poultry and enterotoxemia in many other animal species (16). Isolates of animal origin constitute a risk for transmission to humans through the food chain. *C. perfringens* has been ranked by the Centers for Disease Control (CDC) as one of the most common bacterial causes of food-borne illness in the United States (13). The virulence of *C. perfringens* is largely due to its toxin-producing abilities. To date, 17 *C. perfringens* toxins have been reported (16); however, each individual *C. perfringens* isolate produces only a subset of these toxins. A classification based on the production of four major toxins (alpha, beta, epsilon, and iota) divides the *C. perfringens* into five toxigenic types (A to E). Other toxins, like β 2- or entero-toxin, are found in several toxigenic types and may contribute to disease (16). CDC estimates that about 10,000 cases occur annually in the U.S.

The goals of this study were to recover bacteriophages effective against *C. perfringens* isolates of poultry origin and to evaluate the *in vitro* lytic potential of each bacteriophage individually as well as in a cocktail.

Materials and methods

Bacterial isolates

A total of 156 isolates of *Clostridium perfringens* were recovered from chicken and turkey caeca taken in 5 processing plants (4 chickens and 1 turkey) located in the province of Quebec, Canada. The contents of the caeca were cultured in cooked meat broth (PML, Québec, Canada) for 48 hours in anaerobic conditions at 35°C. Ten µl were then plated on anaerobic blood agar supplemented with gentamicin (PML) and incubated for 24 hours under anaerobic conditions. Colonies with a typical double zone of hemolysis were subcultured for purity on blood agar. Gram staining was performed on every isolate and cultures with Gram-positive square ended rods were selected for PCR identification and genotyping.

PCR identification and genotyping

Identification and genotyping was performed with a multiplex PCR that allows the detection of the toxins genes *cpa* (alpha), *cpb* (beta), *etx* (epsilon), *iA* (iota), *cpb2* (β2- toxin) and *cpe* (enterotoxin) of *C. perfringens*. Primers and conditions were used as previously described (7) with slight modifications to allow smaller sample and reaction volumes. Briefly, DNA extraction was performed with the Chelex 100 (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) ebullition method where many loops of pure colonies of our isolates were mixed with 10% Chelex then boiled for twenty minutes (21). The supernatant contains the DNA used in the multiplex PCR. Each PCR reaction contains: 2.5 µl of 10X PCR Buffer (Amersham Biosciences, Québec, Canada), 1.5 U of Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences, Québec, Canada) and primer sets for *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpe*, and *cpb2*. DNA amplification

reactions were carried out using a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc, Québec, Canada) with the following 35 cycles of 20 sec. at 94°C, 20 sec. at 55°C and 40 sec. at 72°C with a hot start of 5 min at 4°C and a final elongation time of 5 min at 72°C. For visualization of PCR products, 5 µl of the amplicon were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide. A ladder 100 bp (TrackIt, Invitrogen, Ontario, Canada) was used as the marker. *C. perfringens* type EE (AHL#155, positive for *cpa*, *iA*, *cpe* and *cpb2* genes) and *C. perfringens* type B (AHL#156, positive for *cpa*, *cpb* and *etx* genes) were used as positive controls (4).

Bacteriophages isolation

Samples of wooden litter were collected from broiler farms and caeca samples were obtained from processing plants. Bacteriophages were isolated using a modified isolation technique described previously (15). A 100 g litter sample was suspended in 500 ml of TYB media (tryptone 15 g/L, yeast extract 10 g/L and NaCl 5g/L), mixed with bacterial culture of 25 different *C. perfringens* isolates and incubated in anaerobic conditions for 24 hours at 35°C. A 50 ml aliquot was centrifuged at 4000g for 30 min and the supernatant was filtered through a 0.22 µm filter. The filtrate was tested for plaques indicating the presence of lytic bacteriophages using the soft agar technique (11). High-titer (10^8 PFU/ml) bacteriophage solutions were made by inoculating a 10 ml tryptone yeast extract broth with 200 µl of an overnight culture of its replication strain of *C. perfringens* until an OD of 0.1 was reached. The phage solution was mixed with bacterial culture and fresh media at a ratio of 1:3:5 and incubated overnight under anaerobic conditions. The culture was then centrifuged and filtered with a 0.22 µm filter. Bacteriophage Φ3626 was characterized previously (22) and was kindly provided by Dr. Loessner of the Institute of Food Science and Nutrition in

Zurich.

Lytic range determination

Lysis tests were performed using the soft agar spot technique (19). Briefly, 4 ml of soft tryptone yeast extract agar was mixed with 1 ml of bacterial culture of the tested strain and poured on a tryptone yeast extract petri and allowed to cool. A 10 μ l aliquot of different dilutions (10^0 to 10^{-7}) of the phage solution were dropped on the petri and allowed to be absorbed in the soft agar. The plates were incubated overnight in anaerobic conditions. Any plate showing clear plaque was considered positive, while a plate without any plaque was considered negative. The bacteriophage cocktail was prepared by mixing equal volumes of each phage solution (Φ 3626, Φ 2450 and Φ 2084) containing 10^8 PFU.

Electron microscopy

Transmission electronic microscopy was performed as previously described (5). Briefly, 1.5 ml of phage lysate (10^8 to 10^9 PFU/ml) was centrifuged (24000 X g) at 4°C for 1h and the supernatant was discarded. The concentrated lysate was diluted with 1ml of 0.1M ammonium acetate and centrifuged again. The concentrated phage solution was mixed with 15 μ l of staining solution (2% phosphotungstic acid + 0.01% BSA) on a nickel Formvar-carbon-coated grid (Pelco international, Redding, USA). Excess solution was removed. The observations were made at 80 kv on a JEOL 1230 transmission electronic microscope.

Results and discussion

C. perfringens genotyping

One hundred and fifty-six field isolates of *C. perfringens* were recovered from the caeca of turkeys (126 isolates) and chickens (30 isolates). Isolation rates of *C. perfringens* from caeca samples were 66% for turkeys and 16% for broilers. Of those 156 field isolates, 150 were of type A (alpha toxin), one was of type C (alpha and beta toxins) and five were of type E (alpha and iota toxins). The *cpb2* gene (β 2- toxin) was observed in 20 isolates, while no isolate contained the *cpe* gene (enterotoxin). Figure 1 shows the different genotypes observed in this study. Isolation rates were lower for chicken, which is consistent with the findings of Chalmers *et al.* (4). Their study found that isolation was more difficult after the chickens reached 22 days of age due to modifications of the intestinal flora. The majority of the isolates recovered in this study were of type A, which is also the dominant type in the environment (4, 16) as well as the predominant type causing necrotic enteritis in poultry (16). The *cpb2* gene has been associated with increased virulence in animals (3), mainly piglets. The gene *cpb2* has also been found in *C. perfringens* isolates recovered from healthy broiler chickens (4). In addition, a possible role of the β 2 toxin in sporadic diarrhoea in humans has been advanced by recent studies (6, 8). The *C. perfringens* enterotoxin (CPE) is associated with food poisoning in humans (12), and its prevalence is limited in the environment. Previous work has shown that fewer than 5% of the isolates harbour the *cpe* gene (10, 12, 18).

Isolation and lytic activities of bacteriophages

Two lytic phages were isolated from the environment, Φ 2084 from wooden litter provided

by a chicken farm and Φ 2450 from chicken feces. Lytic tests results (Table 1) showed that phages Φ 2084 and Φ 2450 lysed respectively 16% and 21% of our isolates, while the already characterized phage Φ 3626 lysed 7.5%. The lytic spectrum for each phage was very specific, with only a handful of isolates being lysed by more than one phage. All phages produced clear plaques. The cocktail made with the three phages was able to lyse 35% of our isolates. The *C. perfringens* isolates c_2084A and c_2450A were used to propagate phages Φ 2084 and Φ 2450, respectively. High-titer stock could be obtained for both phages, with the Φ 2084 giving the best results with stock reaching 10^9 PFU/ml. The culture collection of *C. perfringens* of this study consisted mainly of isolates from healthy chickens and turkeys. However, four isolates were recovered from clinical cases of necrotic enteritis in chickens. These clinical isolates were all resistant to all phages available. A previous study using pulsed-field gel electrophoresis has shown that in necrotic enteritis cases, one dominant clone of *C. perfringens* takes over the other *C. perfringens* isolates (14). It would be possible that the drop in diversity of clones of *C. perfringens* found during outbreaks of necrotic enteritis might explain the difficulty to recover lytic phages against commensal and clinical isolates of *C. perfringens*. The search for bacteriophages lytic against our clinical isolates is still ongoing.

Little information is available on isolation of *C. perfringens* bacteriophages. In 2002, phage Φ 3626 was isolated and characterized by Zimmer and *al.*(22). The phage had a 21% lytic activity against their culture collection of *C. perfringens*. The difference between both lytic percentages might be explained by the origin of the isolates. Isolates of Zimmer *et al.* (22) were from various food sources and clinical human cases while the isolates in this study were recovered from the normal microflora of chickens and turkeys. This group also

identified a murein hydrolase from phage $\Phi 3626$ that was efficient against all tested *C. perfringens* isolates (23).

Electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) demonstrated that phage $\Phi 2084$ has an icosaedric capsid with a diameter of $58 \pm 2\text{nm}$ (three particules were measured) with a long flexible noncontractile tail of $127 \pm 3\text{ nm}$ (Fig. 2). It appears that $\Phi 2084$ is a member of the *Siphoviridae* family of the order *Caudovirales* (2). The *Siphoviridae* family is the most commonly isolated family of bacteriophages (1). The phage $\Phi 3626$ is also a member of the *Siphoviridae* family. Despite many attempts, it has not been possible to see phage $\Phi 2450$ by TEM; however, phage concentration procedure is underway to increase sensitivity of the TEM.

In conclusion, two novel bacteriophages, $\Phi 2084$ and $\Phi 2450$, associated with lytic activities against *C. perfringens* field isolates of poultry origin were identified in this study. A cocktail of those two phages with a previously characterized bacteriophage, $\Phi 3626$, lysed 35% of our culture collection of *C. perfringens*. Further investigations are underway to characterize these two new promising phages.

Acknowledgements

This work was funded by the Poultry Industry Council (PIC) of Canada. We would like to thank Dr. Hugh Cai for providing control strains for this study, Dr. Sylvain Moineau for the transmission electron microscopy and Dr. Martin Loessner for providing phage Φ 3626.

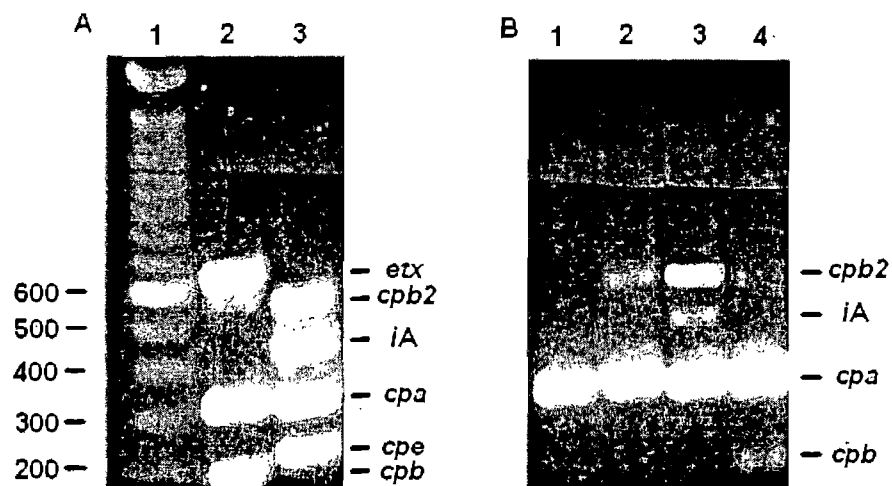
Table 1. Lysis efficiency of *C. perfringens* bacteriophages

Origin of the <i>C. perfringens</i> isolates	Phage Φ 3626 (%) ^b	Phage Φ 2084 (%)	Phage Φ 2450 (%)	Cocktail ^a (%)
Chicken	13.3	10.0	10.0	20.0
Turkey	6.3	17.5	23.8	38.8
Total	7.5	16.0	21.0	35.0

a: The cocktail is an equal mixture of high-titer (10^8 PFU/ml) solutions of bacteriophages Φ 2084, Φ 2450 and Φ 3626.

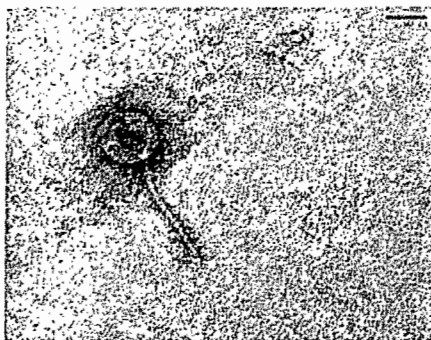
b: percentages of isolates lysed by the phage

Figure 1. Representative genotypes of *C. perfringens* recovered in this study.



Agarose gel of *C. perfringens* PCR genotyping. (A) Lane 1, molecular size standard (in bases pairs, Invitrogen); lane 2, *C. perfringens* control AHL #156 strain (genes *cpa*, *cpb* and *etx*); lane 3, *C. perfringens* control AHL #155 strain (genes *cpa*, *cpb2*, *iA* and *cpe*). (B) Lane 1, *C. perfringens* type A isolate; lane 2, *C. perfringens* type A *cpb2* positive; lane 3, *C. perfringens* type E *cpb2* positive; lane 4, *C. perfringens* type C *cpb2* positive.

Figure 2. Electron microscopy image of phage Φ 2084



Transmission electronic microscope image of phage Φ 2084 at a magnification of 200 000

X. Scale bar = 50 nm.

References

1. **Ackermann, H. W.** 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* **152**:227-43.
2. **Ackermann, H. W.** 1998. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv Virus Res* **51**:135-201.
3. **Bueschel, D. M., B. H. Jost, S. J. Billington, H. T. Trinh, and J. G. Songer.** 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol* **94**:121-9.
4. **Chalmers, G., S. W. Martin, D. B. Hunter, J. F. Prescott, L. J. Weber, and P. Boerlin.** 2007. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol*.
5. **Deveau, H., S. J. Labrie, M. C. Chopin, and S. Moineau.** 2006. Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl Environ Microbiol* **72**:4338-46.
6. **Fisher, D. J., K. Miyamoto, B. Harrison, S. Akimoto, M. R. Sarker, and B. A. McClane.** 2005. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol Microbiol* **56**:747-62.
7. **Garmory, H. S., N. Chanter, N. P. French, D. Bueschel, J. G. Songer, and R. W. Titball.** 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect* **124**:61-7.
8. **Harrison, B., D. Raju, H. S. Garmory, M. M. Brett, R. W. Titball, and M. R. Sarker.** 2005. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene. *Appl Environ Microbiol* **71**:8362-70.
9. **Huff, W. E., G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, and A. M. Donoghue.** 2005. Alternatives to Antibiotics: Utilization of Bacteriophages to Treat Colibacillosis and Prevent Foodborne Pathogens. *Poult Sci* **84**:655-659.
10. **Kokai-Kun, J. F., J. G. Songer, J. R. Czeuczulin, F. Chen, and B. A. McClane.** 1994. Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol* **32**:2533-9.
11. **Loessner, M. J., and M. Busse.** 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol* **56**:1912-8.
12. **McClane, B. A.** 1996. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon* **34**:1335-43.
13. **Mead, P., L. Slutsker, V. Dietz, L. McCaig, J. Bresee, C. Shapiro, P. Griffin, and R. Tauxe.** 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg Infect Dis* **5**:607-25.
14. **Nauerby, B., K. Pedersen, and M. Madsen.** 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol* **94**:257-66.
15. **Seed, K. D., and J. J. Dennis.** 2005. Isolation and characterization of bacteriophages of the *Burkholderia cepacia* complex. *FEMS Microbiol Lett* **251**:273-80.
16. **Songer, J. G.** 1996. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. *Clinical Microbiology Reviews* **9**:216-234.
17. **Toro, H., S. B. Price, S. McKee, F. J. Hoerr, J. Krehling, M. Perdue, and L.**

- Bauermeister.** 2005. Use of Bacteriophages in Combination with Competitive Exclusion to Reduce *Salmonella* from Infected Chickens. *Avian Diseases* **49**:118-124.
18. **Van Damme-Jongsten, M., K. Wernars, and S. Notermans.** 1989. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie Van Leeuwenhoek* **56**:181-90.
 19. **Viscardi, M., A. G. Perugini, C. Auriemma, F. Capuano, S. Morabito, K. P. Kim, M. J. Loessner, and G. Iovane.** 2007. Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC). *Int J Antimicrob Agents*.
 20. **Wagenaar, J. A., M. A. P. Van Bergen, M. A. Mueller, T. M. Wassenaar, and R. M. Carlton.** 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol* **109**:275-283.
 21. **Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi.** 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**:506-13.
 22. **Zimmer, M., S. Scherer, and M. J. Loessner.** 2002. Genomic analysis of *Clostridium perfringens* bacteriophage *phi3626*, which integrates into *guaA* and possibly affects sporulation. *J Bacteriol* **184**:4359-68.
 23. **Zimmer, M., N. Vukov, S. Scherer, and M. J. Loessner.** 2002. The murein hydrolase of the bacteriophage *phi3626* dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl Environ Microbiol* **68**:5311-7.

Contribution des auteurs à l'article 3.2

Louis-Alexandre Jalbert : a effectué toutes les manipulations et a rédigé le manuscrit.

Ann Letellier : a fourni les échantillons de ceaca et a participé à la correction du manuscrit.

Sylvain Quessy : a fourni les échantillons de ceaca.

Josée Harel : a effectué un suivi des expériences et a corrigé le manuscrit.

Marie Archambault : a supervisé les travaux de Louis-Alexandre Jalbert et la rédaction du manuscrit.

4. Discussion

Le projet de recherche a comme objectifs l'étude des déterminants génétiques de la résistance à la bacitracine et l'évaluation *in vitro* du potentiel lytique de bactériophages contre les *C. perfringens*. Afin de réaliser ces objectifs, nous avons construit une banque de souches aviaires de *C. perfringens*. Notre choix s'est porté sur les isolats de la flore normale de poulets et de dindes en raison de la facilité de leur isolement en grand nombre et de l'importance de ces élevages au Québec et au Canada. Nous avons également recueilli des souches provenant de cas cliniques d'entérite nécrotique aviaire.

L'isolement de *C. perfringens* à partir d'échantillons de portions intestinales de poulets et de dindes a été grandement facilité dans notre étude par l'enrichissement préliminaire dans du bouillon à la viande cuite (7). Nos essais préliminaires ont démontré que la quantité d'isolats récupérés était plus élevée lors d'un enrichissement de 48 heures par rapport à un isolement direct ou à un enrichissement de 24 heures. La méthode de sélection des isolats s'est également avérée très spécifique, car tous les isolats potentiels ont été identifiés comme étant du *C. perfringens* lors de la confirmation par multiplex PCR. Le taux d'isolement de *C. perfringens* était de 66% chez la dinde et de 16% chez le poulet. Lors d'une étude menée en 2007, Chalmers *et al.* (31) ont remarqué une baisse du nombre d'isolats de *C. perfringens* récupérés chez les poulets âgés de plus de 22 jours. Cette baisse serait attribuable à une modification de la flore microbienne intestinale et à l'usage possible de bacitracine dans certains élevages.

Le typage par multiplex PCR a donné principalement des isolats de type A, ce qui concorde avec les données obtenues lors d'études précédentes portant sur la flore normale intestinale aviaire (31, 140). Parmi nos 156 souches, nous avons obtenu un isolat de type C et cinq isolats de type E. Le type C est retrouvé moins fréquemment que le type A chez la volaille, mais il est également associé à l'entérite nécrotique, bien que le rôle de la toxine β dans la maladie ne soit pas bien défini (138). Le type E n'est pas associé à une pathologie chez la volaille (140). Le gène *cpe* n'a pas été retrouvé chez nos isolats, ce qui s'explique par le faible taux de présence du gène, moins de 5%, dans les isolats récupérés de l'environnement (82,

99, 138). Le gène *cpb2*, codant pour la toxine $\beta 2$, a été retrouvé dans 13% des isolats (20 isolats). Bien que le gène *cpb2* soit associé à une hausse de la virulence de *C. perfringens* chez les porcelets (23), aucun lien n'a encore été établi chez la volaille (31, 41). D'ailleurs, le gène *cpb2* n'a pas été retrouvé dans nos isolats issus de cas cliniques d'entérite nécrotique.

Un manque de connaissance des facteurs de virulence associés à l'entérite nécrotique rend difficile la caractérisation des isolats. Des études utilisant la caractérisation par électrophorèse en champs pulsés ont démontré que certains clones prédominent lors d'épisodes d'entérite nécrotique (55, 110). Cependant, la toxine alpha, seule toxine létale de *C. perfringens* produite par les isolats de type A, ne semblerait pas impliquée dans la maladie. Des expériences effectuées à l'aide de mutants *plc* ont démontré que des souches ne produisant pas la toxine alpha pourraient néanmoins causer la maladie (79). D'autres études n'ont pu démontrer de corrélation entre le niveau de production de la toxine alpha et le développement de la maladie (66), ni de corrélation entre le niveau de production de la toxine alpha et la gravité des lésions intestinales chez les oiseaux malades (55). L'absence de facteurs de virulence connus associés à l'entérite nécrotique complique l'isolement de souches capables de causer la maladie. En effet, pour pouvoir obtenir des souches que l'on sait capables de causer la maladie, il faut attendre l'éclosion de cas cliniques.

Pour les tests de susceptibilité à la bacitracine, 99 souches de *C. perfringens* ont été testées par la méthode Etest et 26 isolats, soit 26%, se sont avérées résistantes à la bacitracine. Ce chiffre atteint toutefois 38,9% si on considère seulement les échantillons provenant de poulets, alors que les échantillons de dindes atteignent un taux de résistance de 23,5%. Les isolats provenant de poulets ont démontré un plus haut pourcentage de résistance que les isolats provenant de dindes. Peu d'études ont comparé ainsi la résistance à la bacitracine chez des souches de *C. perfringens* provenant à la fois de poulets et de dindes. En 1997, Watkins et ses collaborateurs (158) ont effectué une telle étude et ont obtenu des CMI plus basses pour les isolats de dinde que pour ceux de poulet. Chez le poulet, les CMI₅₀ et CMI₉₀ étaient de 256

$\mu\text{g/ml}$ et de $>256 \mu\text{g/ml}$, alors que les mêmes CMI atteignaient respectivement $8 \mu\text{g/ml}$ et $16 \mu\text{g/ml}$ chez la dinde. Cette différence pourrait possiblement s'expliquer par des régimes antibiotiques différents administrés à chaque espèce. Toutefois, à notre connaissance, il n'existe aucune publication tentant de démontrer un lien entre l'utilisation de la bacitracine à la ferme et le développement d'antibiorésistance envers la bacitracine chez des *C. perfringens* isolés de poulets ou de dindes.

L'utilisation de bandelettes Etest pour déterminer la CMI à la bacitracine chez nos isolats s'est avérée une méthode à la fois simple, rapide et fiable. Toutefois, les comparaisons avec les données de la littérature sont plus difficiles à réaliser car les résultats de tests de résistance à la bacitracine chez *C. perfringens* peuvent varier selon la méthode utilisée. En 1999, Benning et Mathers (13) ont observé une différence de 2 dilutions entre les résultats de CMI à la bacitracine déterminés selon la méthode de dilution en bouillon par rapport à la méthode de dilution en agar. Cette étude démontrait que la technique de dilution en agar était la plus appropriée pour évaluer le niveau de résistance à la bacitracine chez *C. perfringens*, car elle serait la méthode la moins susceptible à un biais (13). La technique Etest nous a semblé la plus appropriée en raison de sa simplicité et de sa similitude avec la technique de dilution en agar. Par contre, les dernières études mesurant le niveau de résistance phénotypique à la bacitracine chez des populations de *C. perfringens* de poulets ou de dindes (31, 74, 158) ont utilisé la technique de dilution en bouillon. Ceci expliquerait la différence entre le haut niveau de résistance à la bacitracine (95%) observé par Chalmers en 2007 (31) chez des souches de *C. perfringens* de poulet et celui observé lors de cette étude, soit 38,9%.

L'absence de points limites déterminés par le « *Clinical and Laboratory Standards Institute* » (CLSI) vient également compliquer la comparaison avec les données publiées. La bacitracine n'étant que peu utilisée en médecine humaine, aucun point limite officiel n'est disponible, si bien que chaque étude peut fixer elle-même son propre point limite. Notre étude et celle de Chalmers *et al.* en 2007 (31) ont utilisé le même point limite, soit $16 \mu\text{g/ml}$, afin de faciliter les comparaisons.

Le choix de la souche c1261_A pour déterminer les séquences des gènes de résistance envers la bacitracine s'est fait en raison de son haut niveau de résistance (> 256 µg/ml). L'identification de gènes de résistance à la bacitracine chez l'isolat c1261_A a été réalisée à l'aide de la technique de marche sur l'ADN (*primer walking*) en raison de l'homologie importante (88% d'homologie sur l'ensemble des gènes) entre nos gènes de résistance et l'opéron *bcrABD* d'*E. faecalis*. Ceci a permis d'utiliser des amorces PCR conçues pour *E. faecalis* et d'obtenir un amplicon à séquencer pour notre isolat. Cette technique peut toutefois s'appliquer de cette façon seulement si une homologie importante existe entre le matériel source et le matériel cible. Le séquençage des gènes *bcrABD* et *bcrR* de la souche c1261_A de *C. perfringens* a ensuite permis des recherches d'homologie avec les séquences connues pour déterminer les fonctions putatives des protéines codées par les gènes découverts.

Les gènes *bcrA* et *bcrB* codent chacun pour une partie d'un transporteur ABC. Ce genre de transporteur est associé à la résistance à la bacitracine chez *B. licheniformis* (120), *B. subtilis* (15), *S. mutans* (149) et *E. faecalis* (96). Toutefois, chez *B. licheniformis*, *B. subtilis*, et *S. mutans*, l'opéron codant pour le transporteur est chromosomique alors qu'il est plasmidique chez *E. faecalis*. La localisation de l'opéron semble aussi avoir un effet sur la nature de la résistance. Lorsque l'opéron est chromosomique, la résistance à la bacitracine est naturelle et semble présente dans toutes les souches de la bactérie, alors que la résistance acquise serait localisée sur un plasmide et se présenterait de façon aléatoire dans les souches bactériennes. Nos résultats concordent avec ces données puisque la résistance à la bacitracine n'est pas présente dans toutes nos souches en plus d'être située sur un plasmide. Le gène *bcrD* code pour une phosphatase du undecaprenyl pyrophosphate. Cet enzyme est associé à la résistance à la bacitracine chez *B. subtilis* (14) et chez *E. coli* (62), mais à un niveau moindre que le transporteur ABC. Bien que les deux mécanismes soient différents et indépendants l'un de l'autre, ils sont situés l'un à côté de l'autre (la distance entre *bcrB* et *bcrD* est de 0 pb). Le gène *bcrR*, code pour une protéine régulatrice qui contient un domaine conservé « *Xenobiotic Response Element* » (XRE). Les protéines de la famille XRE sont pour la plupart peu caractérisées, mais

certaines ont été impliquées dans la réponse au stress (88) et dans la résistance à la bacitracine chez *E. faecalis* (96).

Chez *E. faecalis*, l'opéron *bcrABD* codant pour le transporteur ABC ainsi que le régulateur *bcrR* sont situés sur un plasmide conjugatif d'environ 72 kb (96). Les gènes *bcrABD* et *bcrR* découverts chez *C. perfringens* au cours de cette étude sont situés sur un plasmide d'environ 13 kb. Chez *C. perfringens*, les gènes codant pour les toxines bêta, bêta2, epsilon et iota sont tous situés sur des plasmides conjugatifs (10, 104, 130). Toutefois, la taille des plasmides portant les gènes de toxines varient entre 55 kb et 110kb (77, 86, 116), ce qui exclut une association entre les gènes de toxines et les gènes de résistance à la bacitracine. Le plasmide conjugatif pCW3 de *C. perfringens* est connu pour porter des opérons de résistance à la tétracycline (10, 128, 137), mais sa taille connue de 43 kb suggère qu'il n'y a pas d'association avec les gènes de résistance à la bacitracine. En outre, la majorité de nos souches sont de type A, donc elle ne contiennent pas les plasmides codant pour les toxines bêta, bêta2, epsilon et iota.

L'isolement de bactériophages lytique contre *C. perfringens* s'est effectué en parallèle avec la caractérisation des gènes de résistance à la bacitracine. Le choix de la méthode d'isolement utilisée s'est fait à partir d'essais préliminaires. Deux méthodes d'isolement de bactériophages à partir de l'environnement ont été testées (30, 36). La méthode d'enrichissement en bouillon se déroule ainsi : les matières fécales extraites de l'échantillon sont mélangées à du PBS et filtrées à travers une membrane de 0,22 μm , puis le filtrat est mélangé à une culture de 20 souches de *C. perfringens* et incubés à 35°C pendant 2 jours. Le mélange est alors centrifugé et filtré à nouveau à travers une membrane de 0,22 μm . Ce filtrat est conservé et utilisé lors des tests de lyse sur pétri. La méthode d'isolement direct consiste à mélanger les matières fécales à du PBS, à filtrer à travers une membrane de 0,22 μm et à utiliser directement le filtrat dans les tests de lyse. Seule la méthode d'enrichissement en bouillon de *C. perfringens* a permis d'obtenir des phages efficaces contre nos souches de *C. perfringens*. Nous avons isolé deux phages prometteurs grâce à la méthode d'enrichissement, alors que la méthode d'isolement direct n'a donné aucun

phage pouvant lyser plus d'un isolat de *C. perfringens*. Aucun des phages à notre disposition n'a pu lyser les quatres souches cliniques que nous possédions. Même l'ajout des souches cliniques dans les bouillons d'enrichissement n'a pas permis d'obtenir un phage actif contre ces souches. La constitution d'une banque de souches cliniques plus élaborée permettrait possiblement de contrer cette problématique.

La découverte de phages géants pouvant être retenus par un filtre de 0,22 μm (32) a entraîné la mise en place de tests supplémentaires pour la méthode d'isolement. Toutefois, la filtration des échantillons avec des filtres ayant des pores de 0,45 μm n'a jamais pu éliminer les contaminants, si bien que les filtres de 0,22 μm ont été utilisés pendant la totalité de l'étude.

Nous avons isolé un phage de litière provenant d'un élevage de poulet et un second phage de matières fécales de poulet extraites de ceacums récupérés à l'abattoir. Aucun des échantillons n'avait d'anamnèse d'entérite nécrotique. Les échantillons de matières fécales provenant de poulets souffrant de cas cliniques d'entérite nécrotique n'ont pas permis d'isoler de phages efficaces contre nos isolats. La prévalence d'un clone dominant de *C. perfringens* lors d'entérite nécrotique (55, 110) pourrait peut-être expliquer la difficulté à obtenir un phage doté d'un large spectre de lyse à partir de ces échantillons. Cependant, on se serait attendu à pouvoir isoler un phage lytique contre les souches cliniques à partir d'échantillons de matières fécales provenant d'oiseaux cliniquement malades, alors que les 4 souches issues de cas cliniques se sont montrées résistantes à tous les phages isolés. Cette sélectivité des phages laisse à penser que l'utilisation des phages à titre préventif pourrait modifier l'équilibre entre les différents clones de *C. perfringens* et même causer des cas d'entérite nécrotique. Toutefois, nous n'avons trouvé aucune mention de cas d'entérite nécrotique liés à l'utilisation de facteurs de contrôle. L'éclosion d'épisodes d'entérite nécrotique semble davantage liée aux facteurs prédisposants (voir section 2.2.2) qu'à la modification de la flore bactérienne par un agent de contrôle.

Les tests de lyse sur pétri ont été effectués sur les 156 souches isolées précédemment. Le phage $\Phi 2084$ a lysé 10% des souches de poulets et 17,5% des souches de dindes. Le phage $\Phi 2450$ a lysé 10% des souches de poulets et 23,8% des souches de dindes. Le phage $\Phi 3626$ a été caractérisé par l'équipe de Zimmer en 2002 (164). Toutefois, lors de leurs expériences, le taux de lyse du phage était de 21% alors qu'il est de 13,3% contre nos souches de poulets et 6,3% contre nos souches de dindes. Plusieurs explications sont possibles pour justifier cette différence. En premier lieu, la banque de souches de *C. perfringens* utilisée dans l'étude de 2002 est différente de celle que nous avons bâtie pour cette étude. Leur banque de souches contenait surtout des souches issues d'aliments et de cas cliniques humains, alors que la banque de cette étude contient des souches isolées de la flore normale de poulets et de dindes et quelques souches provenant de cas cliniques d'entérite nécrotique. Une seconde explication concerne la provenance du phage. Le phage $\Phi 3626$ a été isolé de la souche ATCC 3626 de *C. perfringens*, souche qui provenait à l'origine du contenu intestinal d'un agneau. Les phages $\Phi 2084$ et $\Phi 2450$ ont été respectivement isolés de litière prélevée dans un élevage de poulets et de matières fécales de poulets. Étant donné que la méthode d'isolement repose sur une amplification en bouillon dans des souches de *C. perfringens* d'origine aviaire, les phages isolés avec cette technique sont possiblement plus susceptibles de pouvoir se répliquer à l'intérieur de souches de *C. perfringens* d'origine aviaire que le phage $\Phi 3626$.

Le spectre lytique de chacun de nos phages pris individuellement ne permettait pas d'envisager de pousser l'utilisation d'un de ces phages dans un modèle *in vivo*. Toutefois, plusieurs études ont démontré que la formulation d'un cocktail à partir de plusieurs bactériophages différents permettait d'obtenir un spectre de lyse élargi (67, 89, 148, 154, 160). Par exemple, en 2007, Wagenaar *et al.* ont fait des essais de lyse avec des phages contre *Salmonella* Typhimurium et l'équipe a remarqué une hausse de la réduction des comptes de *S. Typhimurium* d'un facteur de 10 à un facteur de 30 lorsqu'il utilisait un cocktail de 2 phages au lieu d'un phage seul (154). Dans notre étude, la combinaison des trois phages $\Phi 2084$, $\Phi 2450$ et $\Phi 3626$ en un cocktail a permis d'obtenir un pourcentage de lyse de 35%,

soit plus haut que n'importe quel phage pris individuellement. Comme certains phages lysaient les mêmes isolats, le spectre lytique du cocktail est légèrement plus bas que la somme des trois phages pris séparément.

Notre collection de souches contient quatre souches provenant de cas cliniques d'entérite nécrotique. Toutefois, aucun de nos phages ne fut capable de lyser les souches d'origine clinique. Une étude utilisant le PFGE a démontré que les souches causant l'entérite nécrotique sont des clones différents de celles de la flore microbienne normale (110). La nature différente de ces souches pourrait expliquer l'inefficacité de nos phages contre elles. De multiples tentatives infructueuses d'isolement de phages à partir d'échantillons cliniques d'entérite nécrotique ont été faits.

Les travaux décrits précédemment auront donc permis de recueillir et de caractériser une collection de 156 souches de *C. perfringens* provenant de poulets et de dindes. De plus, au cours de notre étude, de nouveaux gènes, *bcrABD* et *bcrR*, impliqués dans la résistance acquise à la bacitracine, ont été identifiés, deux nouveaux phages, $\Phi 2084$ et $\Phi 2450$, lytiques contre des souches de *C. perfringens* ont été isolés et finalement, un cocktail de bactériophages capables de lyser 35% de notre collection de souches a été élaboré.

5. Conclusion

Ces travaux visaient à étudier en parallèle les mécanismes de résistance à la bacitracine et le développement d'alternatives aux antibiotiques dans le contrôle de *C. perfringens* chez la volaille. La bacitracine étant utilisée pour contrôler l'apparition de l'entérite nécrotique chez la volaille, une hausse de la résistance à la bacitracine pourrait entraîner des pertes importantes chez les producteurs de volaille. Des gènes codant pour deux mécanismes indépendants de résistance à la bacitracine ont été identifiés et séquencés pour la première fois chez un isolat de *C. perfringens*. À notre connaissance, il s'agit également de la première étude à faire mention de résistance phénotypique à la bacitracine chez des isolats québécois de *C. perfringens*. Des bactériophages ont été isolés de l'environnement et un cocktail capable de lyser 35% de notre banque de souches a été élaboré lors de cette étude.

La caractérisation des gènes de résistance à la bacitracine, *bcrABD* et *bcrR*, découverts dans cette étude se poursuivra au laboratoire. Nous devons maintenant déterminer la fonctionnalité de ces gènes au niveau du phénotype de résistance à la bacitracine. Ceci pourra être effectué en inactivant les gènes *bcrA*, *bcrB*, *bcrD* et *bcrR* par mutagenèse dirigée et en étudiant les effets de ces mutations sur le phénotype des mutants. La mutation séparée de *bcrD*, de *bcrA* et *bcrB* permettrait aussi de vérifier la contribution de chaque mécanisme (transporteur ABC et surproduction de la phosphatase de undecaprenyl pyrophosphate) au phénotype de résistance. Les études précédentes (15) tendent à démontrer que le transporteur ABC contribue à des CMI beaucoup plus élevées que la surproduction de la phosphatase.

Le plasmide d'approximativement 13 kb contenant les gènes de résistance sera également caractérisé par séquençage au laboratoire. En effet, les gènes *bcrABD* et *bcrR* associés à la résistance envers la bacitracine n'occupent qu'environ 4,5 kb sur un plasmide dont la taille est estimée à 13 kb. Le séquençage du plasmide en entier permettrait de vérifier la présence d'autres gènes associés à l'antibiorésistance en dehors des gènes de résistance à la bacitracine. Des études de conjugaison permettraient aussi de vérifier si le plasmide peut se transférer à différentes souches de *C. perfringens* et possiblement à d'autres espèces ou genres bactériens. Il serait également intéressant de vérifier si le plasmide contient la région *tcp* qui est associé

à des plasmides conjugatifs chez *C. perfringens* (10).

L'efficacité du cocktail de phage élaboré dans cette étude pourrait également être améliorée par l'ajout de phages supplémentaires. Ceci permettrait d'élargir encore davantage le spectre de lyse. Toutefois, l'obtention d'un plus grand nombre de souches de cas cliniques faciliterait l'isolement de phages actifs contre ces mêmes souches. À moyen terme, le cocktail de phages a suffisamment de potentiel pour envisager qu'il soit testé *in vivo* une fois qu'il sera complété et à long terme, la caractérisation des phages se retrouvant dans le cocktail permettra de s'assurer de l'innocuité des phages et d'approfondir nos connaissances sur la biologie des phages. Il sera intéressant de regarder à long terme les effets du cocktail de phages autres que la prévention de l'entérite nécrotique.

La bacitracine est présentement utilisée au Canada dans certaines parties de l'industrie avicole. Il est normal d'envisager que son utilisation crée une pression de sélection sur les souches de *C. perfringens* résistantes à l'antibiotique. Éventuellement, les bactériophages pourraient possiblement être considérés en tant qu'alternative valable aux antibiotiques dans le contrôle et le traitement de l'entérite nécrotique chez la volaille.

6. Bibliographie

1. **Abraham, L. J., and J. I. Rood.** 1985. Molecular analysis of transferable tetracycline resistance plasmids from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **161**:636-40.
2. **Ackermann, H. W.** 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* **152**:227-43.
3. **Ackermann, H. W.** 1998. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv Virus Res* **51**:135-201.
4. **Allen, S. D., C. L. Emery, and D. M. Lysterly.** 2003. *Clostridium*, p. 835-856. In P. M. Murray (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, DC.
5. **Amimoto, K., T. Noro, E. Oishi, and M. Shimizu.** 2007. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology* **153**:198-206.
6. **Annett, C. B., J. R. Viste, M. Chirino-Trejo, H. L. Classen, D. M. Middleton, and E. Simko.** 2002. Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathol* **31**:598-601.
7. **Asha, N. J., and M. H. Wilcox.** 2002. Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. *J Med Microbiol* **51**:891-4.
8. **Atterbury, R. J., M. A. Van Bergen, F. Ortiz, M. A. Lovell, J. A. Harris, A. De Boer, J. A. Wagenaar, V. M. Allen, and P. A. Barrow.** 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* **73**:4543-9.
9. **Ba-Thein, W., M. Lystiris, K. Ohtani, I. T. Nisbet, H. Hayashi, J. I. Rood, and T. Shimizu.** 1996. The *virR/virS* Locus Regulates the Transcription of Genes Encoding Extracellular Toxin Production in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **178**:2514-2520.
10. **Bannam, T. L., W. L. Teng, D. Bulach, D. Lyras, and J. I. Rood.** 2006. Functional identification of conjugation and replication regions of the tetracycline resistance plasmid pCW3 from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **188**:4942-51.
11. **Barbara, A. J., H. T. Trinh, R. D. Glock, and J. Glenn Songer.** 2008. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet Microbiol* **126**:377-82.
12. **Barrow, P., M. Lovell, and A. Berchieri, Jr.** 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**:294-8.
13. **Benning, V. R., and J. J. Mathers.** 1999. Comparison of Agar Dilution and Broth Microdilution Methods of Anaerobic Antimicrobial Susceptibility Testing using Several Veterinary Antibiotics against *Clostridium perfringens* Strains Originating from Porcine and Avian Sources. *Anaerobe* **5**:561-569.
14. **Bernard, R., M. El Ghachi, D. Mengin-Lecreulx, M. Chippaux, and F. Denizot.** 2005. BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem* **280**:28852-7.
15. **Bernard, R., P. Joseph, A. Guiseppi, M. Chippaux, and F. Denizot.** 2003. YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **228**:93-7.
16. **Biberstein, E. L., and D. C. Hirsh.** 1999. Chapter 44: The Clostridia, p. 233-235. In D. C. Hirsh and Y. C. Zee (ed.), *Veterinary Microbiology*.
17. **Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powell, R. Carlton,**

- and C. R. Merrill. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* **70**:204-10.
18. **Black, W. A., and F. Van Buskirk.** 1973. Gentamicin blood agar used as a general-purpose selective medium. *Appl Microbiol* **25**:905-7.
 19. **Brennan, J., R. Bagg, D. Barnum, J. Wilson, and P. Dick.** 2001. Efficacy of narasin in the prevention of necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis* **45**:210-4.
 20. **Brennan, J., G. Moore, S. E. Poe, A. Zimmermann, G. Vessie, D. A. Barnum, and J. Wilson.** 2001. Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult Sci* **80**:1451-4.
 21. **Brennan, J., J. Skinner, D. A. Barnum, and J. Wilson.** 2003. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult Sci* **82**:360-3.
 22. **Briers, Y., G. Volckaert, A. Cornelissen, S. Lagaert, C. W. Michiels, K. Hertveldt, and R. Lavigne.** 2007. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages *phiKZ* and *EL*. *Mol Microbiol* **65**:1334-44.
 23. **Bueschel, D. M., B. H. Jost, S. J. Billington, H. T. Trinh, and J. G. Songer.** 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol* **94**:121-9.
 24. **Cain, B. D., P. J. Norton, W. Eubanks, H. S. Nick, and C. M. Allen.** 1993. Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:3784-9.
 25. **Canard, B., and S. T. Cole.** 1989. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6676-80.
 26. **Capparelli, R., M. Parlato, G. Borriello, P. Salvatore, and D. Iannelli.** 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2765-73.
 27. **Carlton, R. M., W. H. Noordman, B. Biswas, E. D. de Meester, and M. J. Loessner.** 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul Toxicol Pharmacol* **43**:301-12.
 28. **Carter, G. R., M. M. Chengappa, and A. W. Roberts.** 1995. Chapter 14: *Clostridium*, p. 134-141. In G. R. Carter, M. M. Chengappa, and A. W. Roberts (ed.), *Essentials of veterinary microbiology*, 5 ed.
 29. **Cato, E. P., W. L. George, and S. F. Finegold.** 1989. *Genus Clostridium*, p. 1141-1182. In J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins.
 30. **Cervený, K. E., A. DePaola, D. H. Duckworth, and P. A. Gulig.** 2002. Phage Therapy of Local and Systemic Disease Caused by *Vibrio vulnificus* in Iron-Dextran-Treated Mice. *Infect Immun* **70**:6251-6262.
 31. **Chalmers, G., S. W. Martin, D. B. Hunter, J. F. Prescott, L. J. Weber, and P. Boerlin.** 2007. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol*.
 32. **Chang, H. C., C. R. Chen, J. W. Lin, G. H. Shen, K. M. Chang, Y. H. Tseng, and S. F. Weng.** 2005. Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage *phiSMA5*. *Appl Environ Microbiol* **71**:1387-

- 93.
33. **Cheng, Q., D. Nelson, S. Zhu, and V. A. Fischetti.** 2005. Removal of Group B Streptococci Colonizing the Vagina and Oropharynx of Mice with a Bacteriophage Lytic Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:111-117.
34. **Cheung, J. K., B. Dupuy, D. S. Deveson, and J. I. Rood.** 2004. The spatial organization of the VirR boxes is critical for VirR-mediated expression of the perfringolysin O gene, *pfoA*, from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **186**:3321-30.
35. **Cheung, J. K., and J. I. Rood.** 2000. The VirR response regulator from *Clostridium perfringens* binds independently to two imperfect direct repeats located upstream of the *pfoA* promoter. *J Bacteriol* **182**:57-66.
36. **Chibani-Chennoufi, S., J. Sidoti, A. Bruttin, E. Kutter, S. Sarker, and H. Brussow.** 2004. *In vitro* and *in vivo* bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2558-69.
37. **Clark, L., C. Greenbaum, J. Jiang, A. Lernmark, and H. Ochs.** 2002. The antibody response to bacteriophage is linked to the lymphopenia gene in congenic BioBreeding rats. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**:205-9.
38. **Coffey, A., and R. P. Ross.** 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**:303-21.
39. **Collier, C. T., C. L. Hofacre, A. M. Payne, D. B. Anderson, P. Kaiser, R. I. Mackie, and H. R. Gaskins.** 2007. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Vet Immunol Immunopathol*.
40. **Cox, P., and R. Buttiglione.** 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, p. 29-43, vol. 1831.
41. **Crespo, R., D. J. Fisher, H. L. Shivaprasad, M. E. Fernandez-Miyakawa, and F. A. Uzal.** 2007. Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. *J Vet Diagn Invest* **19**:329-33.
42. **Dabrowska, K., K. Switala-Jelen, A. Opolski, B. Weber-Dabrowska, and A. Górski.** 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* **98**:7-13.
43. **Deveau, H., S. J. Labrie, M. C. Chopin, and S. Moineau.** 2006. Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl Environ Microbiol* **72**:4338-46.
44. **Drew, M. D., N. A. Syed, B. G. Goldade, B. Laarveld, and A. G. Van Kessel.** 2004. Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poult Sci* **83**:414-20.
45. **Engberg, R. M., M. S. Hedemann, T. D. Leser, and B. B. Jensen.** 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poult Sci* **79**:1311-9.
46. **Fernandez-Miyakawa, M. E., B. H. Jost, S. J. Billington, and F. A. Uzal.** 2007. Lethal effects of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Vet Microbiol*.
47. **Finnie, J. W.** 2003. Pathogenesis of brain damage produced in sheep by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin: a review. *Aus Vet j* **81**:219-221.
48. **Fiorentin, L., N. D. Vieira, and W. Barioni, Jr.** 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* **34**:258-63.
49. **Fischetti, V. A.** 2003. Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. *Ann N Y Acad Sci* **987**:207-14.

50. **Fisher, D. J., M. E. Fernandez-Miyakawa, S. Sayeed, R. Poon, V. Adams, J. I. Rood, F. A. Uzal, and B. A. McClane.** 2006. Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun* **74**:5200-10.
51. **Fisher, D. J., K. Miyamoto, B. Harrison, S. Akimoto, M. R. Sarker, and B. A. McClane.** 2005. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol Microbiol* **56**:747-62.
52. **Garmory, H. S., N. Chanter, N. P. French, D. Bueschel, J. G. Songer, and R. W. Titball.** 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect* **124**:61-7.
53. **Geier, M. R., M. E. Trigg, and C. R. Merrill.** 1973. Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice. *Nature* **246**:221-3.
54. **Gholamiandehkordi, A. R., L. Timbermont, A. Lanckriet, W. Van Den Broeck, K. Pedersen, J. Dewulf, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel.** 2007. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol* **36**:375-82.
55. **Gholamiandekhordi, A. R., R. Ducatelle, M. Heyndrickx, F. Haesebrouck, and F. Van Immerseel.** 2006. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet Microbiol* **113**:143-52.
56. **Gibert, M., C. Jolivet-Reynaud, and M. R. Popoff.** 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* **203**:65-73.
57. **Gibert, M., J. C. Marvaud, Y. Pereira, M. L. Hale, B. G. Stiles, P. Boquet, C. Lamaze, and M. R. Popoff.** 2007. Differential requirement for the translocation of clostridial binary toxins: iota toxin requires a membrane potential gradient. *FEBS Lett* **581**:1287-96.
58. **Grave, K., M. C. Kaldhusdal, H. Kruse, L. M. Harr, and K. Flatlandsmo.** 2004. What has happened in Norway after the ban of avoparcin? Consumption of antimicrobials by poultry. *Prev Vet Med* **62**:59-72.
59. **Guglielmotti, D. M., J. A. Reinheimer, A. G. Binetti, G. Giraffa, D. Carminati, and A. Quiberoni.** 2006. Characterization of spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus delbrueckii* commercial strains. *Int J Food Microbiol* **111**:126-33.
60. **Hansen, E. B.** 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int J Food Microbiol* **78**:119-31.
61. **Harel, J., H. Lapointe, A. Fallara, L. A. Lortie, M. Bigras-Poulin, S. Lariviere, and J. M. Fairbrother.** 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**:745-52.
62. **Harel, Y. M., A. Bailone, and E. Bibi.** 1999. Resistance to bacitracin as modulated by an *Escherichia coli* homologue of the bacitracin ABC transporter BcrC subunit from *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol* **181**:6176-8.
63. **Harmon, S. M., D. A. Kautter, and J. T. Peeler.** 1971. Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol* **22**:688-92.
64. **Harrison, B., D. Raju, H. S. Garmory, M. M. Brett, R. W. Titball, and M. R. Sarker.** 2005. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-

- toxin-encoding gene. *Appl Environ Microbiol* **71**:8362-70.
65. **Higgins, J. P., S. E. Higgins, K. L. Guenther, W. Huff, A. M. Donoghue, D. J. Donoghue, and B. M. Hargis.** 2005. Use of a Specific Bacteriophage Treatment to Reduce *Salmonella* in Poultry Products. *Poultry Science* **84**:1141-1145.
 66. **Hofshagen, M., and H. Stenwig.** 1992. Toxin production by *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens and capercaillies (*Tetrao urogallus*) with and without necrotizing enteritis. *Avian Dis* **36**:837-43.
 67. **Huff, W. E., G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, and A. M. Donoghue.** 2005. Alternatives to Antibiotics: Utilization of Bacteriophages to Treat Colibacillosis and Prevent Foodborne Pathogens. *Poult Sci* **84**:655-659.
 68. **Huff, W. E., G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, and A. M. Donoghue.** 2003. Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian Dis* **47**:1399-405.
 69. **Huff, W. E., G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, and A. M. Donoghue.** 2003. Evaluation of Aerosol Spray and Intramuscular Injection of Bacteriophage to Treat an *Escherichia coli* Respiratory Infection. *Poult Sci* **82**:1108-1112.
 70. **Huff, W. E., G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, and A. M. Donoghue.** 2002. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. *Poult Sci* **81**:1486-91.
 71. **Huff, W. E., G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, and A. M. Donoghue.** 2004. Therapeutic Efficacy of Bacteriophage and Baytril (Enrofloxacin) Individually and in Combination to Treat Colibacillosis in Broilers. *Poult Sci* **83**:1944-1947.
 72. **Huff, W. E., G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, H. Xie, P. A. Moore, and A. M. Donoghue.** 2002. Prevention of *Escherichia coli* Respiratory Infection in Broiler Chickens with Bacteriophages (SPR02). *Poult Sci* **81**:437-441.
 73. **Hughes, M. L., R. Poon, V. Adams, S. Sayeed, J. Saputo, F. A. Uzal, B. A. McClane, and J. I. Rood.** 2007. Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative. *J Bacteriol* **189**:7531-8.
 74. **Johansson, A., C. Greko, B. E. Engstrom, and M. Karlsson.** 2004. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol* **99**:251-7.
 75. **Kahn, C. M.** 2005. Necrotis Enteritis, p. 2210-2211. In C. M. Kahn (ed.), *The Merck Veterinary Manual*, 9th ed.
 76. **Kaldhusdal, M., and M. Hofshagen.** 1992. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. *Poult Sci* **71**:1145-53.
 77. **Katayama, S., B. Dupuy, G. Daube, B. China, and S. T. Cole.** 1996. Genome mapping of *Clostridium perfringens* strains with I-CeuI shows many virulence genes to be plasmid-borne. *Mol Gen Genet* **251**:720-6.
 78. **Kenny, J. G., S. McGrath, G. F. Fitzgerald, and D. V. Sinderen.** 2004. Bacteriophage Tuc2009 Encodes a Tail-Associated Cell Wall-Degrading Activity. *J Bacteriol* **186**:3480-3491.
 79. **Keyburn, A. L., S. A. Sheedy, M. E. Ford, M. M. Williamson, M. M. Awad, J. I. Rood, and R. J. Moore.** 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun* **74**:6496-500.
 80. **Kizerwetter-Swida, M., and M. Binek.** 2005. Selection of potentially probiotic

- Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. Pol J Microbiol **54**:287-94.
81. **Kohler, B.** 2000. *Clostridium perfringens* intoxication affects bird performance. World Poultry **16**:57-59.
 82. **Kokai-Kun, J. F., J. G. Songer, J. R. Czczulin, F. Chen, and B. A. McClane.** 1994. Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. J Clin Microbiol **32**:2533-9.
 83. **Kulkarni, R. R., V. R. Parreira, S. Sharif, and J. F. Prescott.** 2006. *Clostridium perfringens* antigens recognized by broiler chickens immune to necrotic enteritis. Clin Vaccine Immunol **13**:1358-62.
 84. **Kulkarni, R. R., V. R. Parreira, S. Sharif, and J. F. Prescott.** 2007. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. Clin Vaccine Immunol **14**:1070-7.
 85. **Lahti, P., A. Heikinheimo, T. Johansson, and H. Korkeala.** 2007. *Clostridium perfringens* type A isolates carrying the plasmid-borne enterotoxin gene (genotypes IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) are a common cause of food poisonings. J Clin Microbiol.
 86. **Li, J., K. Miyamoto, and B. A. McClane.** 2007. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. Infect Immun **75**:1811-9.
 87. **Liu, J., M. Dehbi, G. Moeck, F. Arhin, P. Bauda, D. Bergeron, M. Callejo, V. Ferretti, N. Ha, T. Kwan, J. McCarty, R. Srikumar, D. Williams, J. J. Wu, P. Gros, J. Pelletier, and M. DuBow.** 2004. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. Nat Biotechnol **22**:185-91.
 88. **Liu, Y., J. Zhou, M. V. Omelchenko, A. S. Beliaev, A. Venkateswaran, J. Stair, L. Wu, D. K. Thompson, D. Xu, I. B. Rogozin, E. K. Gaidamakova, M. Zhai, K. S. Makarova, E. V. Koonin, and M. J. Daly.** 2003. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. Proc Natl Acad Sci U S A **100**:4191-6.
 89. **Loc Carrillo, C., R. J. Atterbury, A. el-Shibiny, P. L. Connerton, E. Dillon, A. Scott, and I. F. Connerton.** 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol **71**:6554-63.
 90. **Loeffler, J. M., D. Nelson, and V. A. Fischetti.** 2001. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. Science **294**:2170-2.
 91. **Loessner, M. J., and M. Busse.** 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. Appl Environ Microbiol **56**:1912-8.
 92. **Lovland, A., and M. Kaldhusdal.** 1999. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. FEMS Immunol Med Microbiol **24**:345-51.
 93. **Lovland, A., and M. Kaldhusdal.** 2001. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. Avian Pathol **30**:73-81.
 94. **Lukashin, A. V., and M. Borodovsky.** 1998. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. Nucleic Acids Res **26**:1107-15.
 95. **Lystiris, M., A. E. Bryant, J. Sloan, M. M. Awad, I. T. Nisbet, D. L. Stevens, and J. I. Rood.** 1994. Identification and molecular analysis of a locus that regulates extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. Mol Microbiol **12**:761-

- 777.
96. **Manson, J. M., S. Keis, J. M. Smith, and G. M. Cook.** 2004. Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3743-8.
 97. **Matsuzaki, S., M. Yasuda, H. Nishikawa, M. Kuroda, T. Ujihara, T. Shuin, Y. Shen, Z. Jin, S. Fujimoto, M. D. Nasimuzzaman, H. Wakiguchi, S. Sugihara, T. Sugiura, S. Koda, A. Muraoka, and S. Imai.** 2003. Experimental Protection of Mice against Lethal *Staphylococcus aureus* Infection by Novel Bacteriophage *phiMR11*. *J Infect Dis* **187**:613-624.
 98. **McClane, B. A.** 2001. The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial junctions. *Toxicon* **39**:1781-1791.
 99. **McClane, B. A.** 1996. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon* **34**:1335-43.
 100. **McReynolds, J. L., J. A. Byrd, K. J. Genovese, T. L. Poole, S. E. Duke, M. B. Farnell, and D. J. Nisbet.** 2007. Dietary lactose and its effect on the disease condition of necrotic enteritis. *Poult Sci* **86**:1656-61.
 101. **Mead, P., L. Slutsker, V. Dietz, L. McCaig, J. Bresee, C. Shapiro, P. Griffin, and R. Tauxe.** 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg Infect Dis* **5**:607-25.
 102. **Merril, C. R., B. Biswas, R. Carlton, N. C. Jensen, G. J. Creed, S. Zullo, and S. Adhya.** 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3188-92.
 103. **Merril, C. R., D. Scholl, and S. L. Adhya.** 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov* **2**:489-97.
 104. **Miyamoto, K., D. J. Fisher, J. Li, S. Sayeed, S. Akimoto, and B. A. McClane.** 2006. Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J Bacteriol* **188**:1585-98.
 105. **Moineau, S., and C. Levesque.** 2005. Control of bacteriophages in industrial fermentations, p. 285-296. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: Biology and Applications*, vol. Chap. 10. CRC Press, Boca Raton, FL.
 106. **Myers, G. S., D. A. Rasko, J. K. Cheung, J. Ravel, R. Seshadri, R. T. DeBoy, Q. Ren, J. Varga, M. M. Awad, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, D. H. Haft, R. J. Dodson, R. Madupu, W. C. Nelson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, H. Khouri, G. I. Dimitrov, K. L. Watkins, S. Mulligan, J. Benton, D. Radune, D. J. Fisher, H. S. Atkins, T. Hiscox, B. H. Jost, S. J. Billington, J. G. Songer, B. A. McClane, R. W. Titball, J. I. Rood, S. B. Melville, and I. T. Paulsen.** 2006. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res* **16**:1031-40.
 107. **Nagahama, M., K. Michiue, and J. Sakurai.** 1996. Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1280**:120-6.
 108. **Nagahama, M., A. Otsuka, M. Oda, R. K. Singh, Z. M. Ziora, H. Imagawa, M. Nishizawa, and J. Sakurai.** 2007. Effect of unsaturated bonds in the sn-2 acyl chain of phosphatidylcholine on the membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin toward liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1768**:2940-5.
 109. **Nakamura, M., A. Kato, D. Tanaka, Y. Gyobu, S. Higaki, T. Karasawa, and T. Yamagishi.** 2004. PCR identification of the plasmid-borne enterotoxin gene (cpe) in

- Clostridium perfringens* strains isolated from food poisoning outbreaks. *Int J Med Microbiol* **294**:261-5.
110. **Nauerby, B., K. Pedersen, and M. Madsen.** 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol* **94**:257-66.
 111. **Neumuller, A. M., D. Konz, and M. A. Marahiel.** 2001. The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem* **268**:3180-9.
 112. **O'Donovan, C. A., P. Fan-Havard, F. T. Tecson-Tumang, S. M. Smith, and R. H. Eng.** 1994. Enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with oral bacitracin. *Diagn Microbiol Infect Dis* **18**:105-9.
 113. **Ohki, R., K. Tateno, Y. Okada, H. Okajima, K. Asai, Y. Sadaie, M. Murata, and T. Aiso.** 2003. A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J Bacteriol* **185**:51-9.
 114. **Ohtani, K., M. Bando, T. Swe, S. Banu, M. Oe, H. Hayashi, and T. Shimizu.** 1997. Collagenase gene (*colA*) is located in the 3'-flanking region of the perfringolysin O (*pfoA*) locus in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett* **146**:155-9.
 115. **Park, S. C., I. Shimamura, M. Fukunaga, K. I. Mori, and T. Nakai.** 2000. Isolation of Bacteriophages Specific to a Fish Pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*. *Appl Environ Microbiol* **66**:1416-1422.
 116. **Petit, L., M. Gibert, and M. R. Popoff.** 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* **7**:104-110.
 117. **Petit, L., E. Maier, M. Gibert, M. R. Popoff, and R. Benz.** 2001. *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Induces a Rapid Change of Cell Membrane Permeability to Ions and Forms Channels in Artificial Lipid Bilayers. *J Biol Chem* **276**:15736-15740.
 118. **Phillips, I.** 1999. The use of bacitracin as a growth promoter in animals produces no risk to human health. *J Antimicrob Chemother* **44**:725-8.
 119. **Podlesek, Z., A. Comino, B. Herzog-Velikonja, and M. Grabnar.** 2000. The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol Lett* **188**:103-6.
 120. **Podlesek, Z., A. Comino, B. Herzog-Velikonja, D. Zgur-Bertok, R. Komel, and M. Grabnar.** 1995. *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* **16**:969-976.
 121. **Pollock, T. J., L. Thorne, M. Yamazaki, M. J. Mikolajczak, and R. W. Armentrout.** 1994. Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *J Bacteriol* **176**:6229-37.
 122. **Prescott, L., J. P. Harley, and D. A. Klein.** 2003. Les Bactériophages, p. 1137. In L. Prescott, J. P. Harley, and D. A. Klein (ed.), *Microbiologie*, 2ème ed. De Boeck, Bruxelles, Belgium.
 123. **Projan, S.** 2004. Phage-inspired antibiotics? *Nat Biotechnol* **22**:167-8.
 124. **Quiberoni, A., J. A. Reinheimer, and V. Suarez.** 1998. Performance of *Lactobacillus helveticus* spontaneous phage-resistant mutants in hard cheese production. *Int Dairy J* **8**:941-949.
 125. **Ramesh, V., J. A. Fralick, and R. D. Rolfe.** 1999. Prevention of *Clostridium difficile*-induced ileocectitis with Bacteriophage. *Anaerobe* **5**:69-78.

126. **Robertson, S. L., J. G. Smedley, 3rd, U. Singh, G. Chakrabarti, C. M. Van Itallie, J. M. Anderson, and B. A. McClane.** 2007. Compositional and stoichiometric analysis of *Clostridium perfringens* enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. *Cell Microbiol* **9**:2734-55.
127. **Rood, J. I.** 1998. Virulence Genes of *Clostridium perfringens*. *Annu Rev Microbiol* **52**:333-360.
128. **Rood, J. I., V. N. Scott, and C. L. Duncan.** 1978. Identification of a transferable tetracycline resistance plasmid (pCW3) from *Clostridium perfringens*. *Plasmid* **1**:563-70.
129. **Sass, P., and G. Bierbaum.** 2007. Lytic activity of recombinant bacteriophage *phi*11 and *phi*12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* **73**:347-52.
130. **Sayeed, S., J. Li, and B. A. McClane.** 2007. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infect Immun* **75**:2391-8.
131. **Schotte, U., U. Truyen, and H. Neubauer.** 2004. Significance of β 2-Toxigenic *Clostridium perfringens* Infections in Animals and Their Predisposing Factors - A Review. *J Vet Med* **51**:423-426.
132. **Seed, K. D., and J. J. Dennis.** 2005. Isolation and characterization of bacteriophages of the *Burkholderia cepacia* complex. *FEMS Microbiol Lett* **251**:273-80.
133. **Shimizu, T., W. Ba-Thein, M. Tamaki, and H. Hayashi.** 1994. The *virR* gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **176**:1616-23.
134. **Shimizu, T., K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, A. Yamashita, T. Shiba, N. Ogasawara, M. Hattori, S. Kuhara, and H. Hayashi.** 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:996-1001.
135. **Shimizu, T., H. Yaguchi, K. Ohtani, S. Banu, and H. Hayashi.** 2002. Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. *Mol Microbiol* **43**:257-65.
136. **Si, W., J. Gong, Y. Han, H. Yu, J. Brennan, H. Zhou, and S. Chen.** 2007. Quantification of cell proliferation and alpha-toxin gene expression of *Clostridium perfringens* in the development of necrotic enteritis in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* **73**:7110-3.
137. **Sloan, J., L. M. McMurphy, D. Lyras, S. B. Levy, and J. I. Rood.** 1994. The *Clostridium perfringens* Tet P determinant comprises two overlapping genes: *tetA(P)*, which mediates active tetracycline efflux, and *tetB(P)*, which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. *Mol Microbiol* **11**:403-15.
138. **Smedley, J. G., 3rd, D. J. Fisher, S. Sayeed, G. Chakrabarti, and B. A. McClane.** 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**:183-204.
139. **Songer, J. G.** 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* **9**:216-34.
140. **Songer, J. G.** 1996. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. *Clinical Microbiology Reviews* **9**:216-234.
141. **Soothill, J. S.** 1994. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by

- Pseudomonas aeruginosa*. Burns **20**:209-11.
142. **Stone, K. J., and J. L. Strominger.** 1972. Inhibition of sterol biosynthesis by bacitracin. Proc Natl Acad Sci U S A **69**:1287-9.
 143. **Stone, K. J., and J. L. Strominger.** 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. Proc Natl Acad Sci U S A **68**:3223-7.
 144. **Sulakvelidze, A., Z. Alavidze, and J. G. Morris Jr.** 2001. Bacteriophage Therapy. Antimicrob Agents Chemother **45**:649-659.
 145. **Summers, W. C.** 2001. Bacteriophage Therapy. Annual Review of Microbiology **55**:437-451.
 146. **Swartz, M. N.** 1990. Chapter 34: Anaerobic Spore-Forming Bacilli: the Clostridia, p. 633-645. In B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, and H. S. Ginsberg (ed.), Microbiology, 4 ed.
 147. **Thacker, P. D.** 2003. Set a Microbe to Kill a Microbe. JAMA **290**:3185.
 148. **Toro, H., S. B. Price, S. McKee, F. J. Hoerr, J. Krehling, M. Perdue, and L. Bauermeister.** 2005. Use of Bacteriophages in Combination with Competitive Exclusion to Reduce *Salmonella* from Infected Chickens. Avian Diseases **49**:118-124.
 149. **Tsuda, H., Y. Yamashita, Y. Shibata, Y. Nakano, and T. Koga.** 2002. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother **46**:3756-64.
 150. **Van Damme-Jongsten, M., K. Wernars, and S. Notermans.** 1989. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. Antonie Van Leeuwenhoek **56**:181-90.
 151. **Van Der Sluis, W.** 2000. Clostridial enteritis is an often underestimated problem. World Poultry **16**:42-43.
 152. **Van Immersel, F., J. De Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle.** 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. Avian Pathology **33**:537-549.
 153. **Viscardi, M., A. G. Perugini, C. Auriemma, F. Capuano, S. Morabito, K. P. Kim, M. J. Loessner, and G. Iovane.** 2007. Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC). Int J Antimicrob Agents.
 154. **Wagenaar, J. A., M. A. P. Van Bergen, M. A. Mueller, T. M. Wassenaar, and R. M. Carlton.** 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol **109**:275-283.
 155. **Wages, D. P., and K. Opengart.** 2003. Necrotic Enteritis, p. 781-785. In Y. M. Saif (ed.), Diseases of poultry. Iowa State Press.
 156. **Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi.** 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques **10**:506-13.
 157. **Watanabe, R., T. Matsumoto, G. Sano, Y. Ishii, K. Tateda, Y. Sumiyama, J. Uchiyama, S. Sakurai, S. Matsuzaki, S. Imai, and K. Yamaguchi.** 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Antimicrob Agents Chemother **51**:446-52.
 158. **Watkins, K. L., T. R. Shryock, R. N. Dearth, and Y. M. Saif.** 1997. In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. Vet Microbiol **54**:195-200.

159. **Williams, R. B.** 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol* **34**:159-80.
160. **Williams Smith, H., and M. B. Huggins.** 1983. Effectiveness of Phages in Treating Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves, Piglets and Lambs. *J Gen Microbiol* **129**:2659-2675.
161. **Williams Smith, H., and M. B. Huggins.** 1982. Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infections in Mice Using Phage: its General Superiority over Antibiotics. *J Gen Microbiol* **128**:307-318.
162. **Williams Smith, H., M. B. Huggins, and K. M. Shaw.** 1987. The Control of Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves by Means of Bacteriophages. *J Gen Microbiol* **133**:1111-1126.
163. **Yoong, P., R. Schuch, D. Nelson, and V. A. Fischetti.** 2004. Identification of a Broadly Active Phage Lytic Enzyme with Lethal Activity against Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* **186**:4808-4812.
164. **Zimmer, M., S. Scherer, and M. J. Loessner.** 2002. Genomic analysis of *Clostridium perfringens* bacteriophage *phi3626*, which integrates into *guaA* and possibly affects sporulation. *J Bacteriol* **184**:4359-68.
165. **Zimmer, M., N. Vukov, S. Scherer, and M. J. Loessner.** 2002. The murein hydrolase of the bacteriophage *phi3626* dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl Environ Microbiol* **68**:5311-7.

7. Publications et communications

Liste des publications et communications réalisées durant les études de maîtrise

Posters :

Jalbert, L., Letellier, A., Harel, J., Vaillancourt, J. & Archambault, M., Utilization of bacteriophage phi 3626 as an alternative to antibiotics for necrotizing enteritis in poultry, Conférence pour la recherche et l'innovation québécoise en agriculture et en agroalimentaire, mars 2006, Université Laval, Québec

Jalbert, L., Letellier, A., Quessy, S., Harel, J., Vaillancourt, J.-P., Boulianne, M., & Archambault, M., *In vitro* evaluation of bacteriophage as an alternative to antibiotics and study on bacitracin antimicrobial resistance of *Clostridium perfringens*, 57ième congrès annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes, Juin 2007, Université Laval, Québec

Présentation orale :

Jalbert, L., Harel, J., Letellier, A. & Archambault, M., Study on bacitracin antimicrobial resistance of *Clostridium perfringens* and *in vitro* evaluation of an alternative to antibiotics, Symposium annuel du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine, Mai 2007, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal, Saint-Hyacinthe

Articles :

Jalbert, L., Tremblay, C., Harel, J. & Archambault, M., Characterization of new genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*, Article en préparation

Jalbert, L., Letellier, A., Quessy, S., Harel, J. & Archambault, M., *In vitro* determination of lytic potential of two bacteriophages against *Clostridium perfringens*, Article en préparation

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Louis-Alexandre Jalbert		JALL30048205
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Louis-Alexandre Jalbert, Cindy-Love Tremblay, Josée Harel, Marie Archambault	
Characterization of novel genes encoding for acquired bacitracin resistance in <i>Clostridium perfringens</i>	
Antimicrobial agents and chemotherapy	En préparation
Louis-Alexandre Jalbert, Ann Letellier, Sylvain Quessy, Josée Harel, Marie Archambault	
In vitro determination of lytic potential of two new bacteriophages against <i>Clostridium perfringens</i>	
Avian Diseases ou Poultry Science	En préparation

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que Louis-Alexandre Jalbert inclue ces articles dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Caractérisation de la résistance à la bacitracine et évaluation <i>in vitro</i> de bactériophages envers les <i>Clostridium perfringens</i> aviaires		
Coauteur Cindy-Love Tremblay	Signature [information retirée / information withdrawn]	Date 29/11/2007
Coauteur Josée Harel	Signature [information retirée / information withdrawn]	Date 11.12.07
Coauteur Ann Letellier	Signature [information retirée / information withdrawn]	Date 10/12/07
Coauteur Sylvain Quessy	Signature [information retirée / information withdrawn]	Date 03/12/07
Coauteur Marie Archambault	Signature [information retirée / information withdrawn]	Date 28/11/2007